

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**CLAIMS****[Claim(s)]**

1. Approach of Detecting Reaction -- it is -- A Biopolymer Ingredient Containing I Reaction Substrate and Many Self-assembly Nature Monomers -- calling -- ii reaction means preparing -- b -- said reaction means -- a Norio Saki withers height molecule ingredient -- exposing -- and -- c -- change of the color of the Norio Saki withers height molecule ingredient in which generating of said reaction partial at least is shown The approach of coming to contain what is detected.
2. Approach according to claim 1 said reaction means includes lipid cleavage means.
3. Claim 1 which contains further step which carries out quantum of change of color of said biopolymer ingredient The approach of a publication.
4. Said biopolymer ingredient is liposome, a thin film, a capillary, the spiral aggregate, and the fiber. It indicates to claim 1 chosen from the aggregate and the group which consists of a solvation polymer. Approach.
5. It is a publication to claim 1 in which said self-assembly nature monomer contains a diacetylene monomer. Approach.
6. Said self-assembly nature monomer is 5, 7-docosa gene acid, 5, and 7-pen TAKOSA gene acid. It is chosen from the group which consists of 10, 12-pen TAKOSA gene acids, and those mixture. Approach containing a diacetylene monomer according to claim 1.
7. said self-assembly nature monomer -- acetylene, alkenes, thiophenes, and Pori Thiophenes, siloxanes, polysilane, aniline, pyrroles, and Pori Acetylene, Pori (p-FIREN vinylene), Pori (p-FIREN), and vinyl PIRIJI it is chosen from NIUMU and the group which consists of those mixture -- being according to claim 1 -- Approach.
8. Direction according to claim 1 where said biopolymer ingredient contains one or more ligands further Law. Said One or More Ligands 9. Protein, Antibody, Carbohydrate, Nucleic Acid, Drug, Chromophore An antigen, a chelate compound, a short chain peptide, pepstatin, Diels-Alder - reagent, molecular recognition complex, an ion radical, the radical of polymerization nature, a linker radical and electron donor An electronic acceptor, a hydrophobic group, a hydrophilic group, an acceptor affinity radical, trisaccharide, tetrasaccharide, and gun griot Group which consists of Cyd GM 1, ganglioside GT1b, sialic acids, and those mixture from -- approach according to claim 8 chosen.
10. To claim 8 in which said one or more ligands have the compatibility over said reaction means The approach of a publication.
11. said biopolymer ingredient contains one or more dopants further -- being according to claim 1 -- Approach.
12. Said One or More Dopants -- Surface Active Agent, Polysorbate, and Octoxynol Sodium dodecyl sulfate, a polyethylene glycol, a dipolar ion detergent, DESHI RUGURUKOSHIDO, deoxycholate, a diacetylene derivative, PhosphaCHIIRUSE Lynn, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine, HOSU A FACHIIRU choline, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, HOSUFU An ACHIIRU methanol, cardiolipin, ceramide, cholesterol, SUTEROI DO, cerebroside, lysophosphatidylcholine, D-erythrosine GOSHIN, Staple fiber INGO myelin, the dodecyl phosphocholine, N-BIOCHI nil phosphatidyl ETANO It is an account to claim 11 chosen from - RUAMIN and the group which consists of those mixture. The approach of \*\*.
13. said one or more dopants -- sialic-acid derivatization diacetylene and lactose induction body-ized diacetylene and amino acid derivatization diacetylene -- and -- those -- mixture -- \*\* -- approach according to claim 11 chosen from a group.
14. Said biopolymer ingredient contains a base material further, and said biopolymer ingredient is said

support. Approach according to claim 1 currently fixed to the body.

15. Said base material is polystyrene, polyethylene, Teflon, a mica, and the SEFA deck. SU, sepharose, a polyacrylonitrile, a filter, glass, gold, SHIRIKO Approach according to claim 14 chosen from NCHIPPU and the group which consists of a silica.

16. The approach according to claim 2 said cleavage means contains lipase.

17. Said lipase is phospholipase A2, phospholipase C, and phospho RIPA. Approach according to claim 16 chosen from the group which consists of ZE D.

18. It is business about the biopolymer ingredient containing an ANARAITO substrate and many self-assembly nature monomers. It is into a Norio Saki withers height molecule ingredient about the sample expected that mind is carried out and said ANARAITO is included. It is \*\* about change of the color of the Norio Saki withers height molecule ingredient in which it carries out and existence of said ANARAITO is shown. The detection approach of the existence of ANARAITO which comes to contain what is come out and done.

19. The approach according to claim 18 said ANARAITO includes a lipid cleavage means.

20. Said biopolymer ingredient is liposome, a thin film, a capillary, the spiral aggregate, and the fiber. It indicates to claim 18 chosen from the aggregate and the group which consists of a solvation polymer. Approach.

21. It is a publication to claim 18 in which said self-assembly nature monomer contains a diacetylene monomer. Approach.

22. Said self-assembly nature monomer is 5, 7-docosa gene acid, 5, and 7-pen TAKOSA gene acid. It is chosen from the group which consists of 10, 12-pen TAKOSA gene acids, and those mixture. Approach containing a \*\* diacetylene monomer according to claim 18.

23. said self-assembly nature monomer -- acetylene, alkenes, thiophenes, and Pori Thiophenes, siloxanes, polysilane, aniline, pyrroles, and Pori Acetylene, Pori (p-FIREN vinylene), Pori (p-FIREN), and vinyl PIRIJI it is chosen from NIUMU and the group which consists of those mixture -- being according to claim 18 -- Approach.

24. Direction according to claim 18 where said biopolymer ingredient contains one or more ligands further Law.

Said One or More Ligands 25. Protein, Antibody, Carbohydrate, Nucleic Acid, A drug, chromophore An antigen, a chelate compound, a short chain peptide, pepstatin, Diels-Alder - reagent, molecular recognition complex, an ion radical, the radical of polymerization nature, a linker radical and electron donor An electronic acceptor, a hydrophobic group, a hydrophilic group, an acceptor affinity radical, trisaccharide, tetrasaccharide, and gun griot Group which consists of Cyd GM 1, ganglioside GT1b, sialic acids, and those mixture from -- approach according to claim 24 chosen.

26. Claim 24 in which said one or more ligands have the compatibility over said ANARAITO The approach of a publication.

27. said biopolymer ingredient contains one or more dopants further -- being according to claim 18 -- Approach.

28. Said One or More Dopants -- Surface Active Agent, Polysorbate, and Octoxynol Sodium dodecyl sulfate, a polyethylene glycol, a dipolar ion detergent, DESHI RUGURUKOSHIDO, deoxycholate, a diacetylene derivative, PhosphaCHIIRUSE Lynn, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine, HOSU A FACHIIRU choline, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, HOSUFU An ACHIIRU methanol, cardiolipin, ceramide, cholesterol, SUTEROI DO, cerebroside, lysophosphatidylcholine, D-erythrosine GOSHIN, Staple fiber INGO myelin, the dodecyl phosphocholine, N-BIOCHI nil phosphatidyl ETANO It is an account to claim 27 chosen from - RUAMIN and the group which consists of those mixture. The approach of \*\*.

29. said one or more dopants -- sialic-acid derivatization diacetylene and lactose induction body-ized diacetylene and amino acid derivatization diacetylene -- and -- those -- mixture -- \*\* -- approach according to claim 27 chosen from a group.

30. Said biopolymer ingredient contains a base material further, and said biopolymer ingredient is said support. Approach according to claim 18 currently fixed to the body.

31. Said base material is polystyrene, polyethylene, Teflon, a mica, and the SEFA deck. SU, sepharose, a polyacrylonitrile, a filter, glass, gold, SHIRIKO Approach according to claim 30 chosen from NCHIPPU and the group which consists of a silica.

32. The approach according to claim 19 said cleavage means contains lipase.

33. Said lipase is phospholipase A2, phospholipase C, and phospho RIPA. Approach according to claim 32 chosen from the group which consists of ZE D.

34. It is Approach of Detecting Inhibitor. A Biopolymer Ingredient Containing I Reaction Substrate and Many Self-assembly Nature Monomers, ii) -- a reaction means -- and iii) Sample expected that an inhibitor is included It prepares. It is 1 about the sample expected that the b aforementioned biopolymer ingredient and said inhibitor are included. It doubles with a clue. c -- the sample expected that said biopolymer ingredient and said inhibitor are included -- the above a reaction means -- exposing -- and -- d -- the existence of change of the color of said biopolymer ingredient -- detecting -- thereby -- said inhibitor Activity is detected. The approach of coming to contain things.

35. It is one or more pairs about change of said color to detect change of the color of said biopolymer ingredient. Approach including making it contrast with a \*\* sample according to claim 34.

36. Claim 34 which contains further the step which carries out the quantum of the change of the color of said biopolymer ingredient The approach of a publication.

37. The approach according to claim 34 said reaction means includes a cleavage means.

38. Said biopolymer ingredient is liposome, a thin film, a capillary, the spiral aggregate, and the fiber. It indicates to claim 34 chosen from the aggregate and the group which consists of a solvation polymer. Approach.

39. It is a publication to claim 34 in which said self-assembly nature monomer contains a diacetylene monomer. Approach.

40. Said self-assembly nature monomer is 5, 7-docosa gene acid, 5, and 7-pen TAKOSA gene acid. It is chosen from the group which consists of 10, 12-pen TAKOSA gene acids, and those mixture. Approach containing a diacetylene monomer according to claim 34.

41. said self-assembly nature monomer -- acetylene, alkenes, thiophenes, and Pori Thiophenes, siloxanes, polysilane, aniline, pyrroles, and Pori Acetylene, Pori (p-FIREN vinylene), Pori (p-FIREN), and vinyl PIRIJI it is chosen from NIUMU and the group which consists of those mixture -- being according to claim 34 -- Approach.

42. Direction according to claim 34 where said biopolymer ingredient contains one or more ligands further Law.

Said One or More Ligands 43. Protein, Antibody, Carbohydrate, Nucleic Acid, A drug, chromophore An antigen, a chelate compound, a short chain peptide, pepstatin, Diels-Alder - reagent, molecular recognition complex, an ion radical, the radical of polymerization nature, A linker radical, electron donor \*\* A child acceptor, a hydrophobic group, a hydrophilic group, an acceptor affinity radical, trisaccharide, tetrasaccharide, gang RIOSHI DO GM 1, ganglioside GT1b, a sialic acid, and group that consists of those mixture Approach according to claim 42 chosen.

44. To claim 42 in which said one or more ligands have the compatibility over said reaction means The approach of a publication.

45. said biopolymer ingredient contains one or more dopants further -- being according to claim 34 -- Approach.

46. Said One or More Dopants -- Surface Active Agent, Polysorbate, and Octoxynol Sodium dodecyl sulfate, a polyethylene glycol, a dipolar ion detergent, DESHI RUGURUKOSHIDO, deoxycholate, a diacetylene derivative, PhosphaCHIJIRUSE Lynn, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine, HOSU A FACHIJIRU choline, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, HOSUFU An ACHIJIRU methanol, cardiolipin, ceramide, cholesterol, SUTEROI DO, cerebroside, lysophosphatidylcholine, D-erythrosine GOSHIN, Staple fiber INGO myelin, the dodecyl phosphocholine, N-BIOCHI nil phosphatidyl ETANO It is an account to claim 45 chosen from - RUAMIN and the group which consists of those mixture. The approach of \*\*.

47. said one or more dopants -- sialic-acid derivatization diacetylene and lactose induction body-ized diacetylene and amino acid derivatization diacetylene -- and -- those -- mixture -- \*\* -- approach according to claim 45 chosen from a group.

48. Said biopolymer ingredient contains a base material further, and said biopolymer ingredient is said support. Approach according to claim 34 currently fixed to the body.

49. Said base material is polystyrene, polyethylene, Teflon, a mica, and the SEFA deck. SU, sepharose, a polyacrylonitrile, a filter, glass, gold, SHIRIKO Approach according to claim 48 chosen from NCHIPPU

and the group which consists of a silica.

50. The approach according to claim 37 said cleavage means contains lipase.

51. Said lipase is phospholipase A2, phospholipase C, and phospho RIPA. Approach according to claim 50 chosen from the group which consists of ZE D.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

Direct colorimetry detection of biocatalyst This application applies on March 3, 1997, and is the U.S. temporary application 60th under current connection / No. 039 or 749.

\*\*\*\*\* is asserted. All the contents of this temporary application shall be included in this specification by citation.

This invention makes a part of research which received a part of exchange of the U.S. Department of Energy in DOE contract-number DE-AC03-76SF No. 00098. The government has a certain fixed right to this invention.

Background of invention This invention relates to the approach and constituent for carrying out direct detection of the conformation change of the film by detecting change of the color of a biopolymer ingredient. Especially this invention enables screening of a reaction inhibitor at the direct colorimetry detection of ANARAITO constituting a film alteration reaction (membrane modifying reaction) and the cause of such an alteration, and a list.

Background of invention The measurement and identification of the activity of various enzymes or other molecules which participate in a membranous rearrangement (for example, especially lipid cleavage, a polymerization, lipid flipping, film penetration signal transfer, the vesiculation, lipid-izing (lipidation), glycosylation, an ion channeling, a molecule rearrangement, and phosphorylation) are important for development of the approach and constituent which adjust membranous biology and a membranous related process (for example, signal transfer). Such an approach and a constituent can find out an application at many symptom (for example, cancer, diabetes-mellitus, virus infection, obesity, etc. are mentioned) lists for accommodation and the therapy of a physiological process (for example, storage, aging, a metabolic turnover, etc. are mentioned).

An interface catalysis is one example of such film reconstruction, and illustrates characterization of these film reconstruction, the advantage of the current technique in an activity, and a limitation. The interface catalysis in a biomembrane plays an important role in the outside of a cell, and an intracellular process including the class of enzyme of the range which exists [ glycosidase / stearylolytic enzyme, acyltransferases, protein kinase, ]. Especially stearylolytic enzyme is participating in the important biochemical process including fat digestion and signal transfer. The role [ in / in the latest interest about the phospholipase A2 (PLA2) (see for example, Kini, Venom Phospholipase A2 Enzymes, Wiley, and Chichester[1997]; and Waite, The Phospholipases, Plenum Press, and New York [1987]) which is one of such the enzymes / emission of the arachidonic acid from the film and lysophospholipid ] is an opportunity. these compounds -- eicosanoid (for example, prostagladins --) It is a precursor for the biosynthesis of leukotrienes and hydroperoxyfatty acid. This eicosanoid It is participating in the inflammatory disease of existing range, such as asthma, ischemia, and rheumatic arthritis. (For example) Bomalaski and Clark, and Arthritis In a list, and Rheumatism 36,190 [1993]; Ramirez and Jain, Proteins:Structure Function, and Genetics, 9,229 [1991]; Dennis And Wong, Phospholipase A2:Role and Function in Inflammation, Plenum, and New York [1990]



are referred to. And vision (see Camras et al., *Ophthalmology* 103, and 1916 [1996]), Platelet aggregation (see Wu, J. Formos, and Med. Assoc. 95, 661 [1996]), Differentiation (see Casimir et al. and Differentiation 60, 203 [1996]) and luteolysis of a fat cell etc. -- it may be participating in many other physiological processes (see Tsai and Wiltbank, *Biol. Reprod.* 57, and 1016 [1997]). Therefore, identification of PLA2 inhibitor is a field studied briskly now, and may bring about development of a new remedy and the new biochemical discernment to the mechanism of enzyme activity (115 Dennis, above-shown; Gelb et al. and *FASEB Journal* 8, 916 [1994]; a list Lin and Gelb, *J. Am. Chem. Soc.* 3932 [1993]).

PLA2 -- a glycerophospholipid -- the catalyst of the hydrolysis of the acyl ester bond like 2-acyl is carried out chiefly, and the fatty acid and lysophospholipid of isolation are generated. As a typical approach of measuring this activity, a discontinuity radiochemistry technique (Ehnholm and Kuusi, *Meth. Enzymol.* 129, 716 [1986]), a fluorescence technique (232 Bayburt et al., *Analytical Biochemistry*, 7 [1995]), and a spectrophotometry technique (Reynold et al. and *Analytical Biochemistry* 204, 190 [1992]) are mentioned. Indicator acyl phospholipid is used as a substrate and these measuring methods estimate enzyme activity with activity, fluorescence, or the absorbance of a fatty acid that cleft. Some technique, especially radiolabeling methods may need to extract and isolate a cleavage fatty acid from an unreacted substrate with the thin-layer chromatography of HPLC. Considering quick analysis (for example, high throughput assay which screens possible enzyme inhibitor) of enzyme activity, it is disadvantageous that an extract process and a synthetic indicator substrate are need. Furthermore, the catalysis of phospholipase tends (it is Wu and Cho, *Analytical Biochemistry* 221, and 152 [1994] to Grainger et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1022, and a 146 [1990]; list) to be influenced by the chemical structure of a phospholipid substrate. Therefore, it is very desirable to use the substrate which exists in the nature by which an indicator is not carried out. The need for the substrate which exists in the nature of this non-indicator is not only applied to the property decision of phospholipase A2 but applied to other nature of arbitration, or an artificial membrane alteration event at other phospholipases (for example, phospholipase C and phospholipase D), general lipase (for example, the triacylglycerol lipase, lipoprotein lipase, and pancreatic lipase), other film alteration enzymes (for example, stearolytic enzyme, acyltransferases, protein kinase, and glycosidase), and a list. The approach and constituent which offer simple detection of an alteration event and enable high throughput screening of an inhibitor especially are desired.

**Outline of invention** This invention relates to the approach and constituent for carrying out direct detection of the conformation change of the film by detecting change of the color of a biopolymer ingredient.

Especially this invention enables screening of a reaction inhibitor at the direct colorimetry detection of ANARAITO constituting a film alteration reaction and the cause of such an alteration, and a list.

This invention offers the approach of detecting a reaction, prepares a reaction substrate, the biopolymer ingredient containing two or more self-assembly nature monomers, and a reaction means, exposes a biopolymer ingredient to a reaction means, and comes to contain detecting change of the color of the biopolymer ingredient in which it is shown that the reaction occurred partially at least. With a certain operation gestalt, this approach includes further the process which carries out the quantum of the change of the color of a biopolymer ingredient.

With a certain operation gestalt, a reaction means includes a lipid cleavage means. With a specific operation gestalt, a cleavage means contains lipase. Lipase is chosen from the group which consists of phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D with a concrete operation gestalt.

This invention offers the approach of being what is chosen from the group which a biopolymer ingredient becomes from liposome, a thin film, a capillary, the spiral aggregate, the fibrous aggregate, and a solvation polymer. With a certain operation gestalt, the self-assembly nature monomer of living body polymeric materials contains a diacetylene monomer. With a certain operation gestalt, a self-assembly nature monomer contains the diacetylene monomer chosen from 5, 7-docosa gene acid (docosadiynoic acid), 5, 7-pen TAKOSA gene acid (pentacosadiynoic acid), 10, 12-pen TAKOSA gene acid, and the group that consists of such combination. A self-assembly nature monomer is chosen from acetylene, alkenes, thiophenes, the poly thiophenes, siloxanes, polysilane, aniline, pyrroles, polyacetylenes, Pori (p-FIREN vinylene (phylenevinylene)), Pori (p-FIREN (phylene)), vinyl pyridinium, and the group that consists of such combination with other operation gestalten.

This invention offers how a biopolymer ingredient comes to contain one or more sorts of ligands further. Ligand is chosen from protein, an antibody, a carbohydrate, a nucleic acid, drugs, a chromophore, an antigen, a chelate compound, a short chain peptide, pepstatin, the Diels-Alder reagent, molecular recognition

complex, an ion radical, a polymerization nature machine, a linker radical, an electron donor, an electronic acceptor, a hydrophobic group, a hydrophilic group, an acceptor affinity radical, trisaccharide, tetrasaccharide, ganglioside GM 1, ganglioside GT1b, a sialic acid, and the group that consists of such combination with a certain operation gestalt. With a certain operation gestalt, ligand has the compatibility over a reaction means.

This invention offers how a biopolymer ingredient comes to contain one or more sorts of dopants further. With a certain operation gestalt, a dopant A surface active agent, polysorbate, the octoxynol, Sodium dodecyl sulfate, a polyethylene glycol, an amphiphilic surface active agent, A DESIRU glucoside (decylglucoside), deoxycholate, A diacetylene derivative, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, Phosphatidic acid, a phosphatidyl methanol, cardiolipin, ceramide, It is chosen from the group which consists of cholesterol, the steroids, cerebroside, lysophosphatidylcholine, D-erythrosine GOSHIN, sphingomyelin, the dodecyl phosphocholine, N-BIOCHI nil phosphatidylethanolamine, and such combination. With a concrete operation gestalt, a dopant contains the diacetylene derivative chosen from sialic-acid derivatization diacetylene, lactose derivatization diacetylene, amino acid derivatization diacetylene, and the group that consists of such combination. With a certain operation gestalt, a biopolymer ingredient contains further the base material which fixes a biopolymer ingredient. A base material is chosen from polystyrene, polyethylene, Teflon, a mica, sephadex, sepharose, polyacrylonitriles (polyacrylonitriles), a filter, glass, gold, a silicon chip, and the group that consists of a silica with a specific operation gestalt.

This invention offers further the approach of detecting the existence of ANARAITO, prepares the substrate to ANARAITO, and the biopolymer ingredient containing two or more self-assembly nature monomers, exposes the sample expected that ANARAITO is included to a biopolymer ingredient, and comes to contain detecting change of the color of the biopolymer ingredient in which existence of ANARAITO is shown. With a certain operation gestalt, ANARAITO includes a lipid cleavage means. With a specific operation gestalt, a cleavage means contains lipase. Lipase is chosen from the group which consists of phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D with a specific operation gestalt. With a certain operation gestalt, a biopolymer ingredient contains one or more sorts of ligands further. With a certain operation gestalt, ligand has the compatibility over ANARAITO.

This invention is what offers the approach for detecting an inhibitor further. A reaction substrate, the biopolymer ingredient containing two or more self-assembly nature monomers, a reaction means, Prepare the sample expected that an inhibitor is included in a list, and the sample expected that a biopolymer ingredient and an inhibitor are included is doubled. It comes to contain exposing the sample expected that a biopolymer ingredient and an inhibitor are included to a reaction means, detecting change of the color of a biopolymer ingredient, and detecting the activity of an inhibitor. With a certain operation gestalt, detection of change of the color of a biopolymer ingredient includes comparing change of a color with one or more contrast samples. With a certain operation gestalt, this approach includes further the process which carries out the quantum of the change of the color of a biopolymer ingredient.

With a certain operation gestalt, a reaction means includes a lipid cleavage means. With a specific operation gestalt, a cleavage means contains lipase. Lipase is chosen from the group which consists of phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D with a concrete operation gestalt.

Explanation of a drawing Drawing 1 shows the schematic diagram of a biopolymer thin film. Y is the thin film of a central symmetry multilayer, and thin films X and Z are non-central symmetry multilayers.

Drawing 2 shows the schematic diagram of biopolymer liposome. A is a cross-section topographic contour plot, and B is the isometric plot of the liposome equally divided into two.

Drawing 3 shows 1 biopolymer liposome and 2 biopolymer thin film which were exposed to the same ANARAITO including the same biopolymer ingredient.

Drawing 4 shows the heating curve which shows the large-scale and main phase transition of the non-polymerization liposome prepared from the PDA monomer.

Drawing 5 shows the schematic diagram of the Langmuir-BUROIETTO equipment which is moving a compression thin film to a vertical panel.

Drawing 6 shows the microphotography of the liposome at the time of cooling only to a room temperature.

Drawing 7 shows the microphotography of liposome prepared while cooling at 4 degrees C.

Drawing 8 shows the chemical structure of 5 and 7-pen TAKOSA gene acid.

Drawing 9 shows the synthetic reaction which embellishes the isolation amino group of a molecule in order

to make it combine with a lipid monomer.

Drawing 10 shows the property of the biopolymer ingredient which consists of an amino acid derivatization diacetylene monomer.

Drawing 11 shows the chemical structure of the sialic-acid derivatization 10, 12-pen TAKOSA gene acid (compound 1) and 10, and 12-pen TAKOSA gene acid (compound 2).

Drawing 12 shows the substrate lipid (namely, DMPC) in the diacetylene system lipid matrix before a polymerization (upper case) and after a polymerization (lower berth).

Drawing 13 shows the visible absorption spectrum of liposome before exposing the liposome of drawing 12 to phospholipase A2 (continuous line), and after being exposed (broken line).

Drawing 14 shows the change in the colorimetry response of the liposome of drawing 12 containing DMPC of various concentration which answers phospholipase A2 exposure.

Drawing 15 is 1 of Ushiro exposed to PLA2 over various time amount, and 2-screw. - (S-decanoyl) The absorbance in 412nm of the liposome containing -1 and 2-dithio-sn-sn-glycero-3-phosphocholine (DTPC) is shown.

Drawing 16 shows <sup>31</sup>P NMR spectrum of the DMPC/PDA vesicle of (B) after (A) and an enzyme reaction before addition of PLA2.

Drawing 17 shows the colorimetry response of the DMPC content liposome under existence of (-) and PLA2, and an inhibitor (\*\* and ◇) under existence of PLA2.

Drawing 18 shows the visible absorption spectrum of the poly diacetylene liposome in a sol-gel matrix.

Drawing 19 shows the visible absorption spectrum of the ingredient of drawing 18 of Ushiro who heated liposome to 55 degrees C.

Drawing 20 shows the optical microscope photograph of a diacetylene thin film.

Drawing 21 shows the property of the poly diacetylene monomolecular layer when not containing with the case where the sialic-acid derivatization PDA and ganglioside GM 1 are included.

Drawing 22 shows the constant-temperature line of PDA as a function of the sub phase (subphase) concentration of CdCl<sub>2</sub> 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%.

Drawing 23 shows the constant-temperature line of 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%PDA in pH 4.5, 5.8, and 9.2.

Drawing 24 shows the effectiveness of temperature over the constant-temperature line of PDA 100%PDA, 5%SA-PDA/95%PDA and 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%.

Drawing 25 shows the visible absorption spectrum of "blue phase" 5%GM1 and 95%5, and 7-docosa gene acid liposome.

Drawing 26 shows the visible absorption spectrum of the liposome Ushiro's drawing 25 exposed to the cholera toxin.

Before exposing drawing 27 to an influenza virus (continuous line), it shows the visible absorption spectrum of a next (broken line) sialic-acid content thin film.

Drawing 28 shows transition of the color of the ganglioside GM1 content liposome according to concentration change of a cholera toxin.

Drawing 29 indicates the visible absorption spectrum of the macromolecule liposome which contains 5 and 7-DCDA 95% to be 5%GM1 ligand.

Drawing 30 shows the visible absorption spectrum of the ingredient Ushiro's drawing 29 exposed to the Escherichia coli toxin. Before exposing drawing 31 to 1-octanol which dissolved in water (line a), it shows the absorption spectrum of a next (line b) PCA thin film.

Drawing 32 shows the bar graph (A) which shows the colorimetry response of the PDA ingredient to various kinds VOC, and the table (B) showing the concentration of VOC.

Drawing 33 shows the graph which compared the colorimetry response to the 1-butanol of the living body polymeric materials to the concentration of 1-butanol.

Drawing 34 shows the compound for manufacturing the PDA derivative which detects a low-molecular organic compound, and a composite outline.

Drawing 35 shows the UV-Vis spectrum of the hexokinase alteration PDA monomolecular layer at the time of adding a glucose as a function of incubation time amount. (A) Background, (B) t= 0.02 minutes, and (C) t= 30 minutes, and (D) t= 60 minutes.

Drawing 36 shows the colorimetry response to the various sugar of a hexokinase content biopolymer ingredient.

Drawing 37 shows derivatization of PDA used for a detection array.

Drawing 38 shows the organic synthesis of the compound 2.10 of drawing 37.

Definition In order to make an understanding of this invention easy, some vocabulary and an expression are defined below.

The vocabulary "a reaction" means change or conversion which carries out a rearrangement or which is reformed chemically of arbitration which combines the matter (for example, a molecule, the film, and a molecular assembly) with other matter, which replaces a component with other matter and to decompose among this specification. The vocabulary "a reaction means" means initiation and/or the means of arbitration which carries out a catalyst for a reaction among this specification. As such a reaction means, although it does not limit, an enzyme, a temperature change, and pH change are mentioned. Although an expression "the compatibility over a reaction means" says the compound which has a predetermined reaction means and the capacity (for example, it joins together) which meets specifically, it is not restricted to the substrate for a reaction means. For example, although PLA2 antibody has the compatibility over PLA2, this antibody is not the substrate of this enzyme.

Among this specification, the vocabulary "immobilization" means making an ingredient combine or restrain by other chemical or approaches to another body (for example, solid phase base material) so that a motion of an ingredient may be restricted.

The vocabulary "an ingredient" is the constituent of the arbitration of the matter in the largest semantics among this specification.

The vocabulary "a biopolymer ingredient" means the ingredient which consists of biomolecules (for example, a lipid, protein, carbohydrates, and such combination) which carried out the polymerization among this specification. As such an ingredient, although it does not limit, a thin film (film), a vesicle, liposome, a multilayer, floc, the film (membrane), and a solvation polymer (for example, cylindrical [ in a solvent ] and the poly thiophene flocs, such as a coiled form) are mentioned.

A biopolymer ingredient can contain the molecule (namely, molecule which does not carry out a polymerization) which does not constitute a polymerization matrix.

Among this specification, the vocabulary "protein" is used in the largest semantics and all the molecules or molecular assemblies containing two or more amino acid are said. As such a molecule, although it does not limit, protein, a peptide, an enzyme, an antibody, an acceptor, a lipoprotein, and a glycoprotein are mentioned.

The vocabulary "an antibody" means the glycoprotein induced by the animal by immunogen (antigen) among this specification. An antibody shows singularity to immunogen and, more specifically, shows singularity to one or more EPUTOPU contained in immunogen. The natural antibody contains at least two light chain polypeptides and at least two heavy chain polypeptides. This field includes the joint domain where each of a heavy chain and a light chain polypeptide interacts with an antigen at the amino-terminus part of a polypeptide chain including a variable region (namely, respectively VH and VL). Each of a heavy chain and a light chain polypeptide also contains the constant region (a part for a carboxy end [ Usually ]) of a polypeptide chain, and this field carries association of the immunoglobulin to the host factor or organization which acts on the various cells of an immune system, some phagocytes, and the 1st component (Clq) of a classic complement system. The constant region of a light chain calls it "CL field", and the constant region of a heavy chain calls it "CH field." The constant region of a heavy chain includes CH1 field, CH2 field, and CH3 field. The part between CH1 field of a heavy chain and CH2 field is called hinge region (namely, "H field"). The constant region of the heavy chain of a cell surface type antibody includes further the spacer-transmembrane domain (M1) and the cytoplasm field (M2) of a film carboxy end. The antibody of a secretor usually lacks M1 and M2 field.

The vocabulary "a biopolymer thin film" means the shape of thin section, and the stratified and used polymerization organic thin film among this specification. As such a thin film, although it does not limit, a monomolecular layer and a dyad layer can be mentioned. A biopolymer thin film can copy a living body (setting in capacity which interacts with other molecules, such as protein or ANARAITO) cell membrane.

The vocabulary "sol-gel" means the preparation object which consists of porous metal oxide glass structures among this specification. Such structure can have the biomaterial or other ingredients which were caught in the vesicular structure. or [ that the restrained ingredient is included with an expression "a sol-gel matrix" ] -- or the structure containing the porous metal oxide glass which is not included is said.

The vocabulary "a sol-gel ingredient" means the ingredient containing the ingredient of the arbitration

restrained in the glass ingredient itself and the vesicular structure of glass of arbitration prepared by sol-gel processing. The vocabulary "a sol-gel method" means the approach of the arbitration which manufactures porous metal oxide glass among this specification. With a certain operation gestalt, a "sol-gel method" says such an approach enforced under quiet temperature conditions. The vocabulary "sol-gel glass" and "metallic-oxide glass" mean the glass ingredient prepared with the sol-gel method, and an inorganic material, or organic/charge of an inorganic admixture is included. As an ingredient used for manufacture of glass, although it does not limit, aluminates, aluminosilicates, titanate, ORUMOSHIRU (ormosils; the silanes embellished organically), and other metallic oxides can be mentioned.

The vocabulary "direct colorimetry detection" means detection of change of the color which does not use agency down stream processing (for example, process which processes change of a color with translation equipment and is changed into an electronic signal) among this specification. It means that this vocabulary includes detection by simple spectrometry in a visual observation (for example, observation by human being's eyes) list.

The vocabulary "ANARAITO" means the ingredient of arbitration which should be analyzed among this specification. As such an ingredient, although it does not limit, ion, a molecule, an antigen, bacteria, a compound, a virus, a cell, an antibody, and a part of cell can be mentioned.

The vocabulary "alternative association" used in this specification means that association with one ingredient and another ingredient is performed in the way depending on existence of the specific molecular structure (namely, specific binding). For example, an acceptor is combined with the ligand bond part, the ligand which has the complementary chemical structure, and a selection target. As for this, "un-alternative association" which is not what an interaction happens freely and is depended on the structural compatibility of molecules is contrastive.

The vocabulary the "biosensor" used in this specification means partially any sensor equipments with which the whole consists of a biological molecule. traditional semantics -- setting -- this vocabulary -- "-- the analysis which consists of a fixed biological ingredient (an enzyme, an antibody, the whole cell, and organelle -- or -- those -- put together) which is closely connected with the suitable inverter which changes a biochemical signal into the electric signal in which a quantum is possible -- an appliance -- implement or system" (Gronow, Trends Biochem.Sci.9:336[1984]) is meant.

The vocabulary the "inverter" used in this specification changes an un-electric phenomenon into electric information, and means the equipment transmitted to the equipment which translates the information into an electric signal. The equipment; optical fiber using the measuring-the strength of the light method, fluorometry, and chemical luminescence as such equipment, and optical direct sensing (for example, diffraction grating coupler); surface plasmon resonance; although there are potentiometry and amperometry electrode; field-effect transistor; piezo-electricity sensing; a surface acoustic wave (SAW), etc., it is not limited to them.

the vocabulary "a miniaturization" used by this detail letter means decreasing sizes, such as size of a sample, in order to raise usefulness (for example, portability, the ease of handling, ease [ array ] of incorporation, etc.).

The vocabulary the "stability" used in this specification means the capacity for a certain ingredient to resist to degradation or a permutation, and to offer dependability and certainty.

The vocabulary "conformation change" used in this specification means change of the molecular structure of a certain matter. It has the intention of this vocabulary also including change (for example, structural change produced when the poly diacetylene interacts with ANARAITO) of the structure of the aggregate of a single molecule or a molecule.

the vocabulary the "small molecule" used by this detail letter is low molecular weight (namely, less than 10,000 a.m.u.s, preferably less than 5,000 a.m.u.s), and means any molecules which combine with ligand in the way of producing conformation change, interact with ligand, or interact with a biopolymer ingredient.

the vocabulary the "pathogen" used by this detail letter is the living thing leading to the illness, a microorganism, or a factor, and although there are a virus, bacteria, a parasite (not limited to them although Protozoa, a platyhelminth, Aschelminthes, a \*\*\*\*\* animal, and the living thing belonging to Arthropoda are included), a fungus, prion, etc., it is not limited to them.

The vocabulary the "bacteria" used in this specification means all the procaryotes belonging to all the gates in the Procaryotae. It has the intention of this vocabulary also including all the microorganisms it is considered that are the bacteria containing a mycoplasma, chlamydia, an actinomyces, a streptomyces, and a

rickettsia. The bacteria of all the forms containing a coccus, a Bacillus, spirohete, spheroplast, a protoplast, etc. are contained in this definition. The vocabulary gram-negative [ "gram-negative" ] and gram-positive [ "gram-positive" ] means the dyeing pattern obtained by Gram's stain actuation in which this industry is sufficient and it is known (for example, refer to Finegold and Martin, Diagnostic Microbiology, 6th Ed. (1982), valve flow coefficient Mosby St.Louis, and pp 13-15).

The vocabulary the "film" used in this specification means the sheet or layer of an ingredient in the reasonable large semantics. It has the intention of this vocabulary including all "biomembranes" (namely, film of what kind of organic nature which is not limited to them although plasmlemma, nuclear membrane, the organelle film, and synthetic membrane are included). Typically, the film consists of a component of a lipid, protein, a glycolipid, a steroid, a sterol, and/or others. The vocabulary the "film fragment" used in this specification also means any membranous parts or fragments. The vocabulary the "polymerization film" means the film which carried out the polymerization partially or completely.

Vocabulary called "the membranous rearrangement" and "conformation change of the film" which are used in this specification means any change of membranous structure. Such change is caused at an especially physical perturbation, heating, an enzyme target, and a chemical reaction. Although there are the cleavage of a lipid, a polymerization, lipid flipping, film penetration signal transfer, the vesiculation, lipid-izing, glycosylation, ion-channel-izing, a rearrangement of a molecule, phosphorylation, etc. as a reaction which brings about a membranous rearrangement, it is not limited to them. The enzyme-catalysis which brings about a membranous rearrangement is brought about as a result of the thing in which it is brought as a result of the interaction (for example, reaction with the enzyme substrate in a biopolymer ingredient) of the enzyme of isolation, and a biopolymer ingredient, and deals, and the enzyme activity which exists in ANARAITO (for example, especially a virus, bacteria, a toxin, etc.), and it deals in it.

The vocabulary the "lipid cleavage" used in this specification means any reactions into which the ingredient which consists of a lipid or a lipid will be divided more than two or it. A "lipid cleavage means" means any means which start and/or carry out the catalyst of the lipid cleavage. Although there are an enzyme, a free radical reaction, and a temperature change as such a lipid cleavage means, it is not limited to them.

The vocabulary the "polymerization" used in this specification includes any processes which are converted into the Oita child which the monomer of a small molecule becomes from a unit repeatedly. Typically, a polymerization is that a monomer forms chemical bridge formation mutually.

The vocabulary the "film acceptor" used in this specification means what is a membranous constituent and can cause other molecules or ingredients, and interactions. As such a constituent, although protein, a lipid, carbohydrates, and those combination are mentioned, it is not limited to them.

"the volatile organic compound" used by this detail letter or the vocabulary "VOC" has reactivity in etc. that is, it is corrosive [ which evaporates quickly / which is explosivity ], and means typically an organic compound which is harmful to human health or a human environment above a certain concentration. Although alcohol, benzene, toluene, chloroform, and a cyclohexane are mentioned as an example of VOC, it is not limited to them.

The vocabulary the "enzyme" used in this specification means the aggregate of chemical and the molecule kept to carry out the catalyst of the biological reaction, or a molecule. Although such a molecule is protein typically, it may consist of a short peptide, RNA, a ribozyme, an antibody, and other molecules.

The vocabulary the "substrate" used in this specification means what is an ingredient or the matter and an enzyme or other reaction means commit to it in a certain semantics. or [ moreover, / that a sample increases this vocabulary on it in another semantics ] -- or the adhering front face is meant. The vocabulary a "reaction substrate" means the substrate for a certain reaction means (for example, a "lipid substrate" reacts to a lipid cleavage means). The vocabulary the "ANARAITO substrate" used in this specification means the ingredient or matter to which ANARAITO reacts. For example, ANARAITO is an enzyme and an ANARAITO substrate is an enzyme substrate. Moreover, in another semantics, if ANARAITO is a pathogen, an ANARAITO substrate will consist of the ingredient or sample changed by the "reaction means" relevant to a pathogen.

The vocabulary the "lipase" used in this specification means anythings of the hydrolase group which works to the ester bond in a lipid. Although there are pancreatic lipase which divides and carries out the catalyst of the hydrolysis of triacylglycerol, lipoprotein lipase which carries out the catalyst of hydrolyzing triacylglycerol and making it glycerol and free fatty acid, and phospholipase as such lipase, it is not limited to them. The vocabulary "phospholipase" means the enzyme to which cleavage of the phospholipid is

carried out by hydrolyzing carbon-oxygen association of phospholipid, or Lynn-oxygen association. Although phospholipase A1, and A2, C and D are mentioned as phospholipase, it is not limited to them. The vocabulary the "drugs" used in this specification means the assembly of the matter used for a diagnosis of the illness or a symptom, a therapy, or prevention, or the matter. Drugs work by changing the life object exposed to it, an organization, a cell, or the physiological element of an in vitro system. Although this vocabulary contains antibacterial and an antifungal and antiviral compound, it has the intention of also including the anti-microorganism agent which is not limited to them. Moreover, it has the intention of this vocabulary also including nature or a composite antibiotic, and the compound produced by recombinant DNA technology.

The vocabulary the "peptide" used in this specification means any matter which consists of two or more amino acid.

The vocabulary the "carbohydrate" used in this specification is the molecule of a certain class, and although it contains sugar, starch, a cellulose, a chitin, glycogen, and the thing of similar structure, it means what is not limited to them. A carbohydrate can exist also as a constituent of a glycolipid and a glycoprotein.

The vocabulary the "chromophore" used in this specification means a compound, an ingredient, the molecule kept in the color of a sample, or a molecule group.

The vocabulary the "antigen" used in this specification means the molecule or molecule group recognized by at least one sort of antibodies. The antigen has at least one epitope (namely, specific biochemical unit in which it is recognized by the antibody and deals) by this definition. The vocabulary "immunogen" means any molecules which induce an antibody production, a compound, or an aggregate. Immunogen has at least one epitope (namely, specific biochemical unit which can trigger an immunoreaction) by this definition. Or the vocabulary the "chelate compound" used in this specification consists of coordinate bond which completes ring closure structure, it means any compounds including coordinate bond.

This compound is combinable with the metal ion combined with at least two of the nonmetal ion in it by coordinate bond.

The vocabulary the "molecular recognition complex" used in this specification means anythings of the molecule which can do what (that is, it interacts with it specifically) one molecule is recognized for, a molecule group, or a molecular complex. For example, the ligand bond part of an acceptor can regard it as molecular recognition complex.

The vocabulary "the surrounding conditions" used in this specification means a surrounding environmental condition (for example, atmospheric temperature of the indoor or outdoor environment where an experiment is conducted).

The vocabulary the "room temperature" used in this specification means the temperature of the range of about 20 to 25 degrees C technically. However, generally this vocabulary means anythings of the temperature of the perimeter in the general area where an experiment is conducted.

Vocabulary called "home testing" and "on-site testing" which are used in this specification means the trial performed outside a laboratory environment. Such a trial is indoor or the outdoors, for example, can be performed at an individual residence, a place of business, public ownership or private land, in the car, underwater, a patient's bedside, etc.

The vocabulary the "lipid" used in this specification means various kinds of compounds characterized by being fusibility in an organic solvent. As such a compound, although there are a fat, a low, a steroid, a sterol, a glycolipid, sphingoglycolipid (ganglioside is included), phospholipid, a terpene, fat soluble vitamin, a prostaglandin, carotene, and chlorophyll, it is not limited to them. The phrase "the ingredient of the lipid base" used in this specification means any ingredients containing a lipid.

the vocabulary the "virus" used by this detail letter has detailed infectivity, and although there is an exception, with an optical microscope, it cannot be observed but means what lacks the independent metabolic system and can reproduce it only in a valid host cell. ; which each particle (namely, virion) has become from husks, or a proteinic coat and a proteinic nucleic acid -- that virion also has how many kinds of film containing a lipid. The vocabulary a "virus" includes the virus of all types including an animal virus, a plant virus, phage, and other viruses.

The phrase the "isolation suspension aggregate" used in this specification means the aggregate which is not fixed.

The vocabulary used in this specification of "wrapping entirely" means the process which will meet if that makes the nest which wraps in two or more sorts of ingredients or is not right so that the ingredient by which



an encapsulation is carried out in the ingredient for encapsulations and on it may be made to fix.

the vocabulary the "light transmission nature" used by this detail letter means the property of a certain thing, the very thing can make light penetrate and the light means what can be observed by what can detect light in viewing (for example, an eye and a detector implement) by it.

The vocabulary used in this specification of "being inactive biologically" is the property of an ingredient, and means that the ingredient does not react to a biological ingredient and a chemistry target.

The vocabulary the "organic solvent" used in this specification means any organic molecules which can dissolve another matter. Although there are chloroform, alcohol, a phenol, and the ether as an example, it is not limited to them.

The vocabulary the "nano structure" where it is used in this specification is microscopic structure, and means the structure typically measured on a nano meter scale. As such structure, it is various kinds of three-dimensions aggregates, and although there are liposome, a thin film, a multilayer, reticulated, lamellae, a swirl, tubular, things of the fiber's form, and those combination, it is not limited to them. Such structure can exist as cylindrical and a solvation polymer of condensed gestalten, such as a coiled form, in some operation gestalten.

or [ an intercept with thin vocabulary called the "thin film" or the "film" used by this detail letter, or / it being stratified and being placed ] -- or any ingredients used are meant.

The vocabulary the "vesicle" used in this specification means the surrounded small structure. The structure is often film which consists of a component relevant to a lipid, protein, a glycolipid, a steroid, or other film.

It is generated naturally, or (for example, vesicle which exists in intracytoplasmic [ which conveys a molecule and shares a specific cell function ]) a vesicle can be compounded (for example, liposome).

The vocabulary the "liposome" used in this specification means the spherical lipid complex which **\*\***(ed) artificially, and it is guided so that it may dissociate from an aquosity medium.

The vocabulary the "biopolymer nature liposome" used in this specification means the liposome which consists of a biopolymer ingredient completely partially.

The vocabulary the "capillary" used in this specification means the ingredient which consists of cylindrical structure of small hollow.

Vocabulary called the "solvation polymer", the "solvation rod", and the "solvation coil" which are used in this specification means the polymerization ingredient of fusibility in an aquosity solution.

The vocabulary the "multilayer" used in this specification means the structure which consists of two or more monomolecular layers. The thin film (film) which each monomolecular layer carries out the interaction of for example, covalent bond, an ionic interaction, the interaction by Van der Waals force, hydrogen bond, hydrophobicity or the hydrophilic aggregate, steric hindrance, etc. chemically mutually, and has a new property (namely, a different property from the property which it had only in the case of the monomolecular layer) is **\*\***(ed).

The "self-assembly nature monomer" and the "lipid monomer" which are used in this specification

The vocabulary to say means the molecule which meets spontaneously and forms the aggregate of a molecule. This vocabulary can mean the surfactant molecule which meets in a sense and forms a surfactant molecular assembly. A single molecule (for example, single lipid molecule) and a small molecular assembly (for example, lipid which carried out the polymerization) are contained in the vocabulary a "self-assembly nature monomer", and by it, each small molecular assembly condenses further (for example, a set and a polymerization), and can turn into a larger molecular assembly. The chemical radical which has an opposite polarity is contained, the monomolecular layer which turned to the fixed direction in respect of phase boundaries is formed, a micell (colloidal particle in condensation colloid) is formed, and the aggregate of a surfactant with each property of washing, foaming, humid-izing, emulsification, and distribution is meant as a "surface activity molecular assembly."

The vocabulary the "homopolymer" used in this specification means the ingredient which consists of monotype polymerization molecular species. The phrase "a mixed polymer" means the ingredient which consists of polymerization molecular species of two or more sorts of types.

The vocabulary the "ligand" used in this specification means ion, a molecule, a molecule radical, or anythings that are other matter, combine with another thing and form bigger complex. Although any molecules combined with a peptide, a carbohydrate, a nucleic acid, an antibody, or an acceptor are included as an example of ligand, it is not limited to them.

The vocabulary the "dopant" used in this specification means the molecule into which it is added by the



biopolymer ingredient and the property of the ingredient is changed. As such a property, although there are temperature sensitivity, pH susceptibility, etc. in a colorimetry response, a color tone, sensibility, endurance, toughness, and the ease of carrying out of immobilization, it is not limited to them. As an ingredient used for a minute amount additive, a lipid, cholesterol, a steroid, An ergosterol, a polyethylene glycol, protein, a peptide, or the film (for example, liposome and a thin film) and what kind of molecule (for example, a surfactant --) of others which can meet Polysorbate, the octoxynol, sodium dodecyl sulfate, both the ionicity detergent, A DESHIRU glucoside, deoxycholic acid, a diacetylene derivative, phosphatidylserine, Phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, a phosphatidyl methanol, Cardiolipin, ceramide, cerebroside, lysophosphatidylcholine, Although there is composition or the natural cell membrane component of D-erythrosine GOSHIN, sphingomyelin, the dodecyl phosphocholine, N-BIOCHI nil phosphatidylethanolamine, and others, it is not limited to them.

Vocabulary called "the organic matrix" and the "living body matrix" which are used in this specification means what is the aggregate of an organic molecule, gathers and serves as bigger many child structure. Although there are a thin film, a monomolecular layer, and a dyad layer as such structure, it is not limited to them. "The organic monomolecular layer" used in this specification

The vocabulary to say means the thin film which consists of a single layer of the molecule which uses carbon as the base. Such a monomolecular layer can consist of a polar molecule with which a hydrophobic end aligns at one side of the monomolecular layer in a certain operation gestalt. The vocabulary the "monomolecular-layer aggregate" means the structure which consists of a monomolecular layer. The vocabulary "an organic macromolecule matrix" is an organic matrix, and means the matrix in which some or all of a molecule structure of the matrix is carrying out the polymerization.

Vocabulary called a "head radical" and a "head radical function" in which it is used in this specification means the molecule radical (for example, carboxylic-acid radical of the end of a fatty acid) which exists in the end of a molecule.

although the vocabulary "the hydrophilic head radical" used by this detail letter is the end of a molecule, is hydrogen bond, Van der Waals force, an ionicity interaction, or covalent bond and is not limited to them, it means the end substantially drawn in water by those chemical interactions. The vocabulary the "hydrophobic head radical" used in this specification is the end of a molecule, and the self-association of it is carried out to other hydrophobic things, and, as a result, it means that by which they are eliminated from water.

The vocabulary the "carboxylic-acid head radical" used in this specification means the organic compound containing one or more carboxyl (-COOH) radicals located in the end of a molecule, or its near. Vocabulary called a carboxylic acid is isolation, or exists as a salt or ester, or says the carboxyl group which is either.

The vocabulary the "detectability head radical" used in this specification means what participates in detection of the component (for example, ANARAITO) which has been a molecule radical in the end of a molecule.

Vocabulary called the "linker" or the "spacer molecule" used in this specification means the matter which makes one thing connect with another thing. One molecule or molecule radical to which covalent bond of other two or more molecules is carried out in a sense (for example, one ligand is connected with a self-assembly nature monomer) can serve as a linker.

The phrase the "macromolecule aggregate front face" used in this specification means the polymeric materials which provide the set of another ingredient with a front face (for example, the thin film which provides association and a set of ligand with a front face or the biopolymer front face of liposome).

The vocabulary "the support for formation" used in this specification also means any equipment or structures of offering support physical for production of an ingredient. Setting in some operation gestalten, the support for formation offers the structure for laminating and/or compressing a thin film.

The vocabulary the "diacetylene monomer" used in this specification means the single copy of the hydrocarbon containing two alkyne bridge formation (namely, carbon / carbon triple bond).

Vocabulary called the "standard trough" and the "standard Langmuir-BUROJETTO trough" which are used in this specification usually means the equipment made from Teflon used in order to manufacture the Langmuir film. The equipment has the mobile partition for compressing the film material placed in the shape of a layer on the reservoir for holding an aqueous solution, and its aqueous solution (for example, refer to Roberts, Langmuir-Blodgett Films, Plenum, New York, and [1990]).

the vocabulary the "crystalline form" used by this detail letter means the configuration and structure of a crystal, and although there are a crystal mold, a direction, an organization, magnitude, etc. in it, it is not

limited to them.

The vocabulary the "domain boundary" used in this specification means the boundary of area where orientation of the polymerization thin film molecule is carried out to homogeneity. For example, it is the physical structure (for example, a filament, \*\*, and a slot) of the poly diacetylene ingredient periodic and arranged regularly as a domain boundary.

The vocabulary the "domain size" used in this specification means the typical die length between a domain and a boundary.

Vocabulary called the "joint (conjugated) principal chain" and the "polymer principal chain" which are used here means what is the en-in polymer principal chain of a polymerization diacetylene thin film, and looks macroscopic to a physical filament or the configuration of \*\*. The vocabulary a "polymer principal chain shaft" means the line on the imagination which runs in parallel with a joint principal chain. "-- intra -- the vocabulary principal chain" and an "interchange principal chain" means the field in a certain given polymer principal chain, and the field between polymer principal chains, respectively. A principal chain means what is a series of lines or "linear filaments", and is extended along a mold front face.

The vocabulary "association" used here means the connection between the atoms of intramolecular, and connection between the molecule under crystal, and ion. The vocabulary "single association" means association to which two electrons occupy the bonding orbital. The method of indicating single association between the atoms in a molecule is shown by one line drawn between two atoms (for example, C8-C9). The vocabulary a "double bond" means association which shares the pair of two electrons. A double bond is more powerful than single association, and more rich in reactivity. The vocabulary a "triple bond" means association which shares the pair of three electrons. The vocabulary "en-Inn" used here means that a double bond and a triple bond interchange mutually. The vocabulary "amine association" and "thiol association" which are used here, and "aldehyde association" An amine radical (namely, chemical group obtained by permuting the hydrogen atom of ammonia by the one or more piece hydrocarbon group), A thiol group (namely, sulfur analog of alcohol) and an aldehyde group (namely, chemical group - that to which CHO was directly connected with another carbon atom) also mean whether it forms between respectively different atoms or molecules, and becoming association.

The vocabulary the "covalent bond" used here means what it is connection between two atoms, and two electrons are shared and is provided with one of every pieces [ them ] from each atom.

The vocabulary "absorption" used here means the absorption of light in a sense. Light is absorbed by the sample, when it is not reflected from a sample or does not penetrate a sample. The sample with a color absorbs alternatively all except the wavelength corresponding to the color of the sample which looks macroscopic among the full wave length of the white light.

The vocabulary the "spectrum" used here means distribution of the light energy arranged in order of wavelength.

The vocabulary the "visible spectrum" used here means the light emission containing the wavelength from about 360nm to about 800nm.

the vocabulary the "UV irradiation" used here -- the light -- being short (namely, less than about 360nm) -- exposure to the radiation which has long wave length (that is, it exceeds about 0.1nm) from an X-ray is meant. Ultraviolet radiation has energy more powerful than the light, therefore is effective by induction of photochemical reaction.

The vocabulary "chromatic transition" used here means change of the molecule or ingredient which causes change of light absorption. In some operation gestalten, change of a color means that to which it is change of the light absorption of a sample and change of the detectable color accompanying the change takes place by it. Although this detection includes macroscopic observation and spectral analysis, it can be performed by various kinds of approaches which are not limited to them.

The vocabulary "thermostat chromatic transition" used here means change of the color started by change of temperature.

or [ that, as for the vocabulary the "solid phase base material" used here, multistory / of the sample / is carried out on it ] -- or the solid body or solid front face to which it adheres is meant. As a solid phase base material, it divides, and although glass, a metal, gel, and a filter paper are mentioned, it is not limited to them. A "hydrophobic solid phase base material" means the solid phase base material which was processed chemically, or was \*\*(ed) so that it might become so so that a hydrophobic thing may be drawn and water may be crawled.

The vocabulary the "perimeter [ thin film ] interface field" used here means the thin film front face (that is, it is not a front face in contact with a solid phase base material) exposed to a surrounding environment or a surrounding ambient atmosphere.

Although the vocabulary "the solvent for formation" used here is an volatile organic solvent typically, it means any media used in order to distribute an ingredient over it locating [ which he solubilizes and wishes ] (to for example, the front face for \*(ing) a thin film or the desiccation container for being placed in order to dry a liposome ingredient).

The vocabulary the "micell" used here means the particle of the magnitude of the colloid which has the external surface of a hydrophilic property, and a hydrophobic inside.

The vocabulary the "topochemical reaction" used here means the reaction which occurs inside a certain specific location (for example, reaction which occurs only when the spacial configuration of the specific part of intramolecular or a specific molecule exists).

The vocabulary the "mold structure" where it is used here means the solid phase base material used as mold for designing in the form and magnitude to wish.

The vocabulary the "array" used here and "the patternized array" means the arrangement to the ingredient or equipment of an element (namely, thing). For example, considering as ANARAITO detection equipment combining the biopolymer ingredient of the number type which has a different ANARAITO recognition radical constitutes an array.

The vocabulary the "obstacle" used here is not ANARAITO which exists in an ANARAITO sample and should be detected, detection equipment does not identify it preferably or ANARAITO means what is considered that it can distinguish.

Or one person who is working under the environment where can carry and ANARAITO is detected walks around with the vocabulary the "BADGE" used here, it means any equipments which can be attached to the body.

the vocabulary the "equipment" used here means any equipments (for example, -- many -- the plate of a well, and the BADGE) containing living body polymeric materials. The biopolymer ingredient can be fixed or incorporated in equipment. The biopolymer ingredient of one or more sorts of types can be incorporated to one equipment.

The vocabulary "halogenation" used here means the process which incorporates a halogen (namely, a fluorine, chlorine, a bromine, iodine, and each element of an astatine) in a molecule, or its extent.

The vocabulary the "aromaticity" used here means that an aromatic series radical (namely, six rings and the derivative of those) exists in a molecule.

The vocabulary the "water immiscible solvent" used here means the solvent which does not dissolve in water at any rate. The phrase a "water miscibility solvent" means the solvent which dissolves in water at any rate.

The vocabulary negative [ which are used here / the "positivity" and negative / "negative" ], and "dipolar ion nature" is the radical of a molecule or molecularity, and means a positivity and the thing which has a negative or neutral charge as a whole, respectively. The electric charge of the thing of dipolar ion nature was carried out to the positivity, and it has the atom or radical which carried out the electric charge to negative, and the charge of the both sides is negated (that is, the charge as the whole is zero).

The vocabulary the "biological organism" used here means anythings of the life object which uses carbon as the base.

The vocabulary "inch situ" used here means that to which a process, an event, an object, or information exists in the situation of those natural environments, or happens there.

The vocabulary the "aquosity" used here means the liquid mixture which divides although there are other constituents, and contains water.

The vocabulary the "solid state" used here means one or more sorts of reactions which contain the solid-state's compound or it is hard.

The vocabulary used here of "having been put regularly" means periodic arrangement of the molecule in a compression thin film.

The vocabulary "filtration" used here means the process which divides various kinds of constituents in a sample offering sample into each other. In a certain operation gestalt, filtration means separating a solid-state from a liquid or a gas using the film or a medium. Moreover, in another operation gestalt, this vocabulary also includes that separation of an ingredient is performed based on the relative magnitude of

that.

The vocabulary the "inhibitor" used here means the ingredient which makes a chemical reaction late or is stopped, a sample, or the matter. or [ that the vocabulary the "reacting method inhibitor" delays an activity or activity of a certain specific reacting method (for example, enzyme) ] -- or the inhibitor which can be stopped is meant.

The vocabulary "inhibitor screening" used here means any approaches used in order [ which identifies an inhibitor ] to reach and to investigate/or a property. An inhibitor screening procedure is offering the capacity which screens the sample of a large number which may include "high throughput screening, i.e., an inhibitor," to the inside of a short time preferably. Moreover, probably, it will be desirable for an inhibitor screening procedure to offer the quantitative result for offering the comparison of the effectiveness of an inhibitor.

The vocabulary the "sample" used here is used in the sense of the wide sense. In a sense, the vocabulary can mean a biopolymer ingredient. In another semantics, the vocabulary means the specimen obtained from what kind of the source or culture medium, and that biological and an environmental sample are included. A biological sample can be obtained from an animal (Homo sapiens is included), and also includes a liquid, a solid-state, an organization, and a gas. As a biological sample, plasma, a blood serum, and a blood product similar to it are included. As an environmental sample, environmental ingredients, such as a charge of facing, soil, water, a crystal, and an industrial sample, are contained. These instantiation should not be interpreted as what limits the type of a sample applicable by this invention.

Rough explanation of this invention This invention relates to the approach and constituent for carrying out direct detection of the change of membranous conformation by detecting change of the color of a biopolymer ingredient. The direct detection by the colorimetry of ANARAITO especially kept by this invention to the reaction and such an alteration which change the film, and screening of a reaction inhibitor are attained. If collapse of the membrane structure which consists of a biopolymer ingredient takes place, the ingredient will produce change of a detectable color (for example, it is macroscopically detectable). This invention is divided, and although lipid cleavage, a polymerization, lipid flipping, film transparency signal transfer, the vesiculation, lipid-izing, glycosylation, ion-channel-izing, reconstruction of a molecule, phosphorylation, etc. are included, the direct detecting method by the colorimetry of various kinds of film collapse events which are not limited to them is offered. Since it can experiment even if it is the observer who has not received training, and a result can be judged and those approaches can be performed under surrounding conditions, those approaches are made usable at the usage of a large number which are not limited to them, although the object for a home diagnosis, the object for fieldwork, the air or the object for detection of an underwater ingredient, the object for military affairs, a medical office or the object for sites, and many other applications are included. This invention does not need an energy source but a tough detection technique without cheapness, stability, accuracy, high-reliability, and fluctuation is offered. By improvement in these engine performance, it is quick and right-ratio color screening offers investigating screening (for example, drugs screening) of a new molecular entity library, and identification and the description of enzyme inhibitor, the trial of drugs, the trial of a waterworks, and a foundation ideal for any desirable applications.

With a desirable operation gestalt, the living body polymeric materials of this invention offer the approach of measuring enzyme activity by the single step by detecting change of the color of a lipid [ diacetylene / which encloses a natural enzyme substrate / "the signal is emitted" ]. This structure needs neither addition of a chemical agent nor the analysis method after hydrolysis. Furthermore, identification of enzyme inhibitor can be quickly performed only by acting as the monitor of the change of the microtiter plate of 96 standard wells, or the color of the aquosity vesicle suspension in a thing equivalent to it.

Joint polymers (CP), such as the poly diacetylene (PDA), the poly thiophene, and polypyrrole, are temperature changes (thermochromism) (Levesque and Leclerc, Chem).

A series of change of the color produced from association (IONOKUROMIZUMU) (Levesque and same-as-the-above; and Marsella et al., Am.Chem.Soc.117, 9842[1995]) of Mater.8, 2843[1996], mechanical stress (MEKAKUROMIZUMU) (Galiotis et al., J.Polymer Science 21, 2483 [1983]), or ion is shown. Change of a color can be attributed to change of the effective bond length of the delocalized principal chain of a pi-joint polymer (Tanaka et al., Macromolecules 22, 1208 [1989]). Detection of the biological target of these "clever" ingredients (Biotechnology clo MIZUMU) for example, Charych et al. and Chemistry & Biology 3,113 [1996]; -- Reichert et al. and J.Am.Chem.Soc.117,829[1995]; -- Charych et

al. -- Science 261,585 [1993] ;P an and Charych, Langmuir 13, Cheng and Stevens, Chemistry and Physics of Lipids 87 and 1365 [1997];41[1997];, and Cheng The application refer to and Stevens and Advanced Materials 9,481 [1997] just began to be considered. These ingredients show the quick response time, selectivity, and the optical signal that can carry out a monitor easily. As an isolation suspension aggregate in a solution, the detection agent of these lipid bases has a chance of becoming a simple assay system. Taking the gestalt of a fixed thin film, liposome, or others, these detection agents offer the durable tough colorimetry sensor which can be easily incorporated into small detection equipment (for example, BADGE for detection).

Unlike the technique (for example, refer to United States patent No.5,268,305 and No.4,859,538) of other polymerization lipid bases, the approach and constituent of this invention offer change of a detectable color macroscopically [ a polymer ingredient ], and do not need use of an inverter. With other techniques, the change in a polymer ingredient is identified, and it translates into a signal, and is dependent on the lipid ingredient used together with the inverter using the equipment using the method of measuring the strength of the light for changing into the information which human being can read and understand, fluorometry, and chemical luminescence, an optical fiber, a grating coupler, surface plasmon resonance, potentiometry and an amperometry electrode, a field-effect transistor, piezo-electric sensing, or a surface acoustic wave (SAW). Although an inverter and it bar a miniaturization to these equipments and the source of power is needed for them, there are big weak spots, such as being dependent on the inverter. For these disadvantageous points, these equipments are too complicated, are expensive, and must have been dealt with and carried out to many of usual detection applications, such as fieldwork and use at home. Furthermore, since acquisition of that stability is missing and a living thing ingredient was difficult for many of these equipments, the use was limited.

the new biotechnology which this invention becomes from the chemical modification of the PDA-vesicle by interface enzymes, such as phospholipase A2 (PLA2), in some operation gestalten -- the Chromatic detecting method is offered. These approaches offer the new path which guides the biotechnology clo MIKKU effectiveness. Change of the color of a vesicle solution is caused in a desirable operation gestalt by the hydrolysis of a natural non-marker enzyme substrate which carried out embedding beforehand into the PDA matrix. In other operation gestalten, this invention shows that biotechnology Chromatic transition of a PDA vesicle is controlled by addition of a known phospholipase inhibitor, and offers the application to drugs discovery of a high throughput.

This invention offers the array of the biopolymer ingredient incorporated by single equipment so that a response which is [ as opposed to / the reaction from which each section of a biopolymer ingredient differs ] different to one certain reaction again can be carried out. such an array can be designed so that existence of a certain specific reaction may produce change of a color in the known location in the equipment or change of a specific color may be produced for the given reaction from blue to red for example, the reaction X -- the orange from purple -- Reaction Y. In order to show existence of the specific matter, a compound, or a reaction, using an array including a mark like "+" which can be understood easily is also included in this invention. It does not have intention that this invention is limited to a specific array design or a specific arrangement configuration.

This invention offers the approach and constituent which can clarify the description of the membranous rearrangement which can conquer many disadvantageous points (for example, use of the harmful ingredient of indirect detection, purification of a sample, cost and radioactivity, or others etc.) of various techniques available now.

Detailed description This invention consists of the approach and constituent about the biopolymer ingredient into which a color is changed according to a membranous rearrangement (for example, lipid cleavage).

Although these biopolymer ingredients have a thin film, a vesicle, capillary structure, multilayer structure, a solvation rod, a coil, etc., they include the gestalt of a large number which are not limited to them. These ingredients contain the self-assembly nature monomer which carried out the polymerization. In some operation gestalten, a biopolymer ingredient contains two or more sorts of self-assembly nature monomers. Some of these self-assembly nature monomers lack the radical in which a polymerization is possible. In other operation gestalten, the ingredient contains further the dopant which changes the property of a sensor. Although any molecules of others which optimize the self-assembly nature monomer in which a polymerization is possible as a dopant, a non-polymerization nature self-assembly nature monomer, a lipid, a sterol, a film constituent, and a biopolymer ingredient (for example, the stability of an ingredient,

endurance, colorimetry responsibility, and ease of immobilization) are included, it is not limited to them. A biopolymer ingredient can contain ligand (for example, protein, an antibody, a carbohydrate, and a nucleic acid) further. Ligand can be used as a part from which the attachment site for supplying a molecule to a biopolymer nature front face is offered, or the joint event in the part starts change of a color into a biopolymer ingredient as a bonding site of ANARAITO. Various kinds of operation gestalten of this invention offer the capacity to detect a wide range reaction and wide range ANARAITO with a colorimetric method. If a specific biopolymer ingredient is used, change of the color according to a reaction can be seen by the color tone sensing device by simple macroscopic observation or request. This invention offers various kinds of approaches of fixing a biopolymer ingredient further, and stability, endurance, and the ease of handling and use are acquired by immobilization. In some operation gestalten, it considers as the single equipment for making the array which has combined the biopolymer ingredient with which various kinds differ. The array can be designed so that the type or amount from which a reaction or ANARAITO differs can be detected and distinguished (that is, the array can offer quantitative and/or qualitative data). The approach and constituent of this invention can be used in a wide range ANARAITO detection environment, are especially simple and can be used in a situation as which quickness and the exact and cheap detecting method are required.

explanation of this invention -- following matter: -- gestalt [ of I. biopolymer ingredient ]; -- II. self-assembly nature monomer; -- III. dopant; -- IV. ligand; -- detection [ of change of V. color ]; -- detection [ of conformation change of VI. film ]; -- it is divided into fixed [ of a VII. biopolymer ingredient ];, and a VIII. array. The biopolymer ingredient indicated by each of these knots can be designed so that existence of ANARAITO (for example, a pathogen, a chemical, and protein) can be detected, or it can be designed so that a membranous rearrangement (for example, lipid cleavage event) may be detected. Probably, in some operation gestalten, it will be desirable that it is the biopolymer ingredient which is equipped with the both sides of these functions. If a biopolymer ingredient is optimized on the occasion of detection of the rearrangement of ANARAITO or the film (for example, optimization of colorimetry responsibility, a color, and stability), it will become applicable to the scenario of the both sides usually often. It has indicated, when there is a different point.

I Gestalt of a biopolymer ingredient The biopolymer ingredient of this invention can take the gestalt of liposome, a thin film and multilayer structure, and a large number that are not limited to them although the form of reticulated, lamellae, a swirl, a capillary, and the fiber is included further. In some operation gestalten, it is the solvation polymer of that a biopolymer ingredient is cylindrical and the gestalt condensed [ coiled form ]. It focuss on those advantages and faults conquered during development of these ingredients, and those each is described below.

A. Thin film In some operation gestalten, the biopolymer ingredient of this invention forms a biopolymer thin film. A biopolymer thin film is prepared by carrying out multistory [ of the desired matrix formation ingredient (for example, self-assembly nature organic monomer) ] on the base material for formation as given in an example 1. In a desirable operation gestalt, the base material for formation is a standard Langmuir-BUROIETTO trough (Langmuir-Blodgett trough), and multistory [ of the matrix formation ingredient ] is carried out on the aquosity front face made by filling a trough with an aquosity solution. The polymerization of the ingredient is compressed and carried out, and a biopolymer thin film is made to form. In the desirable operation gestalt, the compression was performed by using the mobile barrier in order to compress a matrix formation ingredient all over a standard Langmuir-BUROIETTO trough. Compression was performed until the monomolecular layer of the matrix formation ingredient packed tightly was formed.

A thin film offers the screen for colorimetric analyses of high sensitivity very much [ ANARAITO ]. With some operation gestalten, the polymerization of the matrix formation ingredient located in the base material for formation is carried out to an example 1 by UV irradiation as a publication. Although all the approaches of a polymerization are included by this invention and have a gamma ray exposure, X-ray irradiation, chemical bridge formation, and electron beam exposure, they are not limited to them. In some operation gestalten, the diacetylene monomer (DA) was used as a self-assembly nature monomer. The polymerization of the diacetylene monomer (DA) was carried out using UV irradiation, and it considered as the poly diacetylene (p-PDA or PDA). In the desirable operation gestalt, the source of UV irradiation was enough separated from the thin film, in order to avoid that the damage by heat happens to a thin film. Although the crystalline form of a polymer nature thin film can be easily observed between the polarizing plates with which the optical microscope intersected perpendicularly, this invention does not

require this step. The joint principal chain (namely, en-Inn) with which the double bond produced after polymerization-izing and a triple bond interchange by turns produces strong absorption in a visible spectrum, and comes to show blue peculiar to a polymerization diacetylene thin film / purple appearance to it.

In a certain operation gestalt, in order to analyze further, the blue thin film was macroscopically transferred to the hydrophobic solid phase base material so that a carboxylic-acid tip radical might be exposed in a perimeter [ thin film ] environmental interface field (Charych et al. and Science 261:585 [1993]). However, the step is not needed by the approach of this invention. A typical linear filament can observe with a polarization microscope to a PDA thin film. This ingredient can also investigate the description using the approach of examining the property of an electron microscope or others (for example, refer to an example 2). The approach of some others is also learned as an approach of making a thin film from this industry, and all the methods of **\*(ing)** other thin films are included in this invention at the place to mean.

For example, a thin film can be **\*(ed)** by solvent casing (namely, gradual evaporation of a solvent).

Moreover, a lipid monomer can make the solid phase base material by which the coat was immersed and carried out into the solution in the solid phase base material by **\*(ing)** using a silane or a thiol anchoring radical. A diacetylene monomer is tied by a silane and the thiol group, and, subsequently a polymerization is carried out. A trough is not needed by this approach.

B. liposome others -- in an operation gestalt, the biopolymer ingredient of this invention contains biopolymer nature liposome. Although contained at the place where this invention means any methods of **\*(ing)** liposome, liposome was prepared by probe sonic disintegration (New, Liposomes:A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp 33-104 [1990]). a self-assembly nature monomer is independent [ its ] -- it is -- it was made to meet with desired ligand, it dried in order to remove the solvent for formation, and it re-suspended in deionized water. The polymerization of the suspension was ultrasonicated and carried out with the probe. The liposome solution obtained as a result contained biopolymer nature liposome.

Liposome differs from the monomolecular layer and the thin film in respect of the both sides of an approach required in order to **\*(ing)** the physical property and it. The monomolecular layer and thin film (or multilayer) which are made from an amphiphilic compound are flat film, and form two-dimensional structure. In this relation, a monomolecular layer and a thin film are solid materials currently supported with the solid used as an underlay, as shown in drawing 1 . A thin film Y is a multilayered film of central symmetry, and thin films X and Z are the multilayers of non-central symmetry. It is indicated by many reference and such an ingredient is Ulman (). [ Ulman, ] [ An Introduction to Ultrathin Organic Films:From Langmuir-Blodgett to ] Self-Assembly, Academic Press Inc., Boston, [1991], And the total theory is carried out by Gaines (Gaines, Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Interscience Publishers, New York, [1966]) etc. It is the three-dimensions-vesicle which encloses a water tooth space as liposome is shown in drawing 2 compared with a thin film and a monomolecular layer. Drawing 2 shows the two-dimensional Fig. of A cross section, and the three-dimension Fig. of the one half of B liposome. These ingredients are indicated by many reference and the total theory is especially carried out by New (New, Liposomes:A Practical Approach, IRL Press, Oxford, [1989]), Rosoff (Rosoff, Vesicles, Marcel Dekker, Inc., New York, [1996]), etc.

Liposome can be built so that an ingredient may be wrapped in in the aquosity compartment. A thin film and a monomolecular layer do not enclose an aquosity tooth space, and do not wrap in an ingredient within a compartment. Liposome is stable and tougher than the thin film made from the typically same ingredient. Liposome and a thin film are prepared by different approach. Liposome is prepared by distribution in the aquosity media of an amphiphilic molecule, and remains in the liquid phase. On the other hand, a monomolecular layer and a thin film are prepared by fixing the molecule of an air-water interface field amphiphilic by the way. Subsequently, the interface field is passed for a solid phase base material, and a thin film is transported to a solid phase base material. Liposome exists in uniform aqueous suspension and may be **\*(ed)** in the form of varieties, such as the shape of a globular shape, an ellipse form, a square, a rectangle, and a capillary. Therefore, the front face of liposome is a liquid. - Only water is mainly contacted. In some viewpoints, liposome is similar with the three-dimension-structure of a natural cell membrane. If liposome is dried and it is made a solid state, liposome loses the configuration and cannot exist any longer as a liposome condition (that is, it is not "liposome" any longer). On the other hand, a thin film exists as flat uneven coating fixed on the solid phase base material. The front face of a monomolecular layer or a thin film can be contacted into air, other gases, or other liquids. A thin film can be dried in air, and the flat monomolecular layer or multilayer structure is maintained, therefore there is no change in being a "thin



film."

With a liposome solution, since the consistency of the cross section is larger as compared with a monomolecular-layer assembly, concentration of the ingredient which carried out the polymerization can be far made high. Usually, change of a color is made easy to recognize more macroscopically and liposome has the advantage of increasing a colorimetry response (for example, drawing 3 shows the colorimetry response to existence of the influenza virus of fixed sialic-acid content liposome (1) and a thin film (2)).

Some difficulties had to be conquered when designing the approach of **\*(ing)** the liposome of this invention. Although it expected that liposome could be **\*(ed)** at the beginning using the self-assembly nature monomer ingredient (for example, diacetylene) used with the operation gestalt (and operation gestalt [ Namely, a **\*\*\*\*** ] of the thin film of this invention given in an example 1) which **\*\*** various kinds of thin films, since the structures of liposome and a thin film mainly differed, it was strange whether this was possible. Liposome is not two-dimensional and is three-dimension-like. therefore, 1 diacetylene-ized lipid actually forms liposome -- 2 -- carrying out the polymerization of it, if the lipid is able to form liposome -- 3 [ and/or, ] -- it was not clear about the point whether a colorimetry property is shown noting that it carried out the polymerization.

It was not clear in whether the diacetylene-ized lipid of a single chain actually forms liposome about the 1st point. The large majority of reference is because it was shown that the molecule of a single chain tends to form a micell (namely, suspension of the single dyad layer packed loosely), and only the molecule of a duplex chain can form liposome on the other hand. Furthermore, as New (New, same as the above) has stated, unlike the diacetylene-ized lipid of this invention, the duplex chain molecule used for liposome formation is what originated in the natural cell membrane typically, and has the classic phospholipid structure which usually incorporated molecule-like constituents, such as phospho diglyceride and sphingolipid.

At first, the liposome formation by the diacetylene-ized lipid was agitated violently, and was tried on standard approaches, such as immersion sonication, (namely, approach similar to the approach usually applied to phospholipid). By these approaches, liposome could not be formed, and it did not distribute by insolubility, but featureless mixture was formed. This mixture did not show the property which can carry out colorimetry. It was measured using the differential scanning calorimetry that  $T_m$  (the main phase transition temperature) of a lipid is much higher than that to which those natural phospholipid corresponds. For example, drawing 4 shows the heating curve which shows the big main phase transition over the liposome which **\*(ed)** the lysine from the PDA monomer used as the derivative, and which has not carried out a polymerization. Therefore, it was required to adopt the approach of high energy, to make temperature higher than  $T_m$ , and to distribute a lipid from those, such as ultrasonic probe processing and heating. Under these conditions (for example, conditions given in an example 1), liposome was formed and with light scattering and a transmission electron microscope, it was checked as it is the size (namely, about 100nm) of liposome. About the 2nd point, a lipid needs to pack in a certain precise spacing and precise direction to each other carrying out a polymerization. Therefore, the polymerization of the poly diacetylene is a "solid state" or a topochemical-polymerization. This is the reason which must be packed densely for a molecule to construct a bridge. This precise packing is controllable by the monomolecular layer and the thin film in the place of an air-water interface field using the mobile barrier of Langmuir equipment (the thin film which compresses into packing of a request as shows a thin film to drawing 5 , and was compressed in it is transported to a perpendicular plate.). The compression from such the outside is impossible for the case of liposome formation. Lipids gather and are restored to the location in spacing and the direction which will be in equilibrium at each other. Therefore, it was not clear whether before development of this invention, since a polymerization reaction occurs, the distance and the packing condition between the molecules in the inside of a liposome ingredient were enough.

At first, the most difficult point was constructing a bridge in a liposome diacetylene-ized lipid monomer, and **\*(ing)** the poly diacetylene joint polymer (namely, polymerization liposome). The joint polymer principal chain offered the liposome which enabled it to detect biological ANARAITO by change of a desired color and the color which can be checked with the naked eye produced when ANARAITO combines with the liposome. however, after liposome was formed (namely, an above-mentioned approach -- using) and being cooled to the room temperature, it became clear that they did not carry out a polymerization at all to your making it exposed to ultraviolet rays. Since it must have crystallized and the lipid must have returned to that solid-state Mr. condition in principle when it cooled to a room temperature (that is, it must have performed



the above topochemical-polymerizations once the lipid returned to this condition), this was a surprising thing. However, the lipid was still a liquid that that is not right and clearly. Furthermore, it was shown by analysis by the transmission electron microscope that liposome is not crystallizing. These room temperatures (it prepared)

The description of a stable-sized liquid phase liposome was shown as liposome condensed, and became a bigger spherule and it was shown in the microscope Fig. of drawing 6. Based on these observation results, the assumption whether there was any hysteresis effectiveness was formed to heating/cooling curve of these ingredients. It became clear that this is right and it led to development of the "super-cooling" method. In the super-cooling method, it was cooled by 4 degrees C, consequently liposome succeeded in crystallization of a lipid. After performing a cooling step, even if it returned liposome to the room temperature, carrying out the polymerization was found out. The polymerization was checked by the blue of an ingredient, and about 630nm absorption. It crystallized a square, a rectangle, an ellipse form, or in the shape of a ball, and the structure was maintained all the time as these liposome was shown in the microscope Fig. of drawing 7 compared with the liposome which was not super-cooled.

All the above-mentioned experiments that \*\* the suitable liposome as various kinds of operation gestalten (namely, above-mentioned experiment) of this invention make the approach used in order to \*\* a thin film, and direct contrast. The polymerization of the thin film is formed and carried out at the same temperature (namely, ambient temperature).

Even if it used polymerization liposome about the 3rd point, it was strange whether before development of this invention, change of a color was shown according to collapse of the living body quantity molecularly film. For example, it was not known whether the lipid packing structure where liposome differs will cause change of the color which can be observed with a thin film operation gestalt. The liposome optimal for colorimetry detection of ANARAITO was developed by furthermore having experimented.

C. other gestalten others -- with operation aspect, it is meant that deformation of the ingredient of heating and a cooling rate, the stirring method, and a biopolymer ingredient offers other nano structures. although such nano structure is not what is limited -- a multilayer -- it knits and a string, lamellae, a swirl, the shape (tubular) of a capillary, \*\*\*\* Mr. configurations, and those combination are included. With a certain operation aspect, such structure can be the solvation polymer (solvated polymer) of a condensation gestalt like a rod and a coil. For example, influencing the type of the floc which the chain length of a monomer forms in a solution is shown (Okahata and Kunitake, J.Am.Chem.Soc.101:5231[1979]). it is based on a surface active substance -- these -- others -- production of a gestalt -- 2 chains (Kuo et al. and Macromolecule 23:3225 [1990]), lamellae (Rhodes et al. and Langmuir 10:267 [1994]), and a hollow capillary -- and it knits and the string (Frankel et al., J.Am.Chem.Soc.116[1994]) is indicated. The colorimetry capillary was produced with a certain operation aspect. As indicated by the example 1, the capillary was prepared like liposome, when it removed having added 1 - 10% of organic solvent (for example, ethanol) to the solution before sonication (sonication).

This invention means other suitable configurations for desired specific use.

With other operation aspects, the meltable polymer of the poly thiophene is producible.

With a certain operation aspect, a sugar machine, a peptide, or other ligands can be compounded as a thiophene derivative, and a polymerization can be carried out as a copolymer after that. A ligand radical can be made to adhere, after it carries out the polymerization of the NHS derivative of a thiophene and a polymer (it indicated below like) forms instead. A thiophene polymer makes an acid radical add and make it aqueous. Thus, it can compound so that these may be freely dissolved in a water solution, and a colorimetry solution can be produced.

II. self-assembly nature monomer With a certain specific operation aspect, this invention means various self-assembly nature monomers (self-assembling monomer) suitable for formation of a biopolymer ingredient. Although this monomer is not limited, it contains acetylene, diacetylene (for example, 5, 7-docosa gene acid, 5, 7-pen TAKOSA gene acid and 10, 12-pen TAKOSA gene acid), an alkene, a thiophene, the poly thiophene, imide, acrylamide, methacrylate, vinyl ether, a maleic anhydride, urethane, allylamine, a siloxane, polysilane, an aniline, a pyrrole, polyacetylene, Pori (PARAFENIREMBINIREN), Pori (PARAFIREN), and vinyl pyridinium. The lipid containing these radicals can be a homopolymer or a mixed polymer. Furthermore, although not limited, a monomer with various head radicals containing a carboxylic acid, hydroxyl, a primary amine functional group, an amino acid derivative, and a hydrophobic group is meant. A certain specific head radical acts as a recognition site combined with ANARAITO, and

direct colorimetry detection is enabled only by exposing a biopolymer ingredient to ANARAITO. Even if the living body polymeric materials of this invention come to contain the self-assembly nature monomer of a single (for example, all were made from 5 and 7-pen TAKOSA gene acid) kind, they may come to contain two or more kinds. In order to make a biopolymer ingredient from the self-assembly nature monomer of one or more types, the solvent containing each monomer is combined by the desired mole ratio. Then, it prepares as this mixture was indicated above (for example, thin film preparation being made to carry out the stratification on the water front face of Langmuir BUROJETTO (Langmuir-Blodgett) equipment, or liposome preparation being evaporated, and making a water solution re-suspend). With a certain operation aspect, a self-assembly nature monomer can be chemically combined with other molecules (for example, ligand).

With desirable operation aspect, a diacetylene monomer is used as a self-assembly nature monomer of the biopolymer ingredient of this invention. Although this invention is not limited, it means that various diacetylenes containing 5, 7-docosa gene acid (5, 7-DCDA), 5, 7-pen TAKOSA gene acid (5, 7-PCA) and 10, and 12-pen TAKOSA gene acid (10, 12-PCA) are included.

This invention means further optimization of the biopolymer ingredient which maximizes the response to a given reaction condition. In order to use this invention, it is not required to understand the device, and playing a role with the chemistry of the specific lipid used for a biopolymer ingredient important for an increment or fall of colorimetry transition sensibility although this invention is not limited by it is meant. For example, location change of a chromophore polymer principal chain can change the sensibility to given ANARAITO. This can be attained by carrying out migration of the diacetylene radical by the interface field soon, as illustrated to drawing 8 which shows 5 (contrasting with 10 and 12-pen TAKOSA gene acid), and 7-pen TAKOSA gene acid. With a certain operation aspect, colorimetry sensibility has improved remarkably by changing arrangement of a polymerization possible radical into the 5 or 7th place of a monomer (see the example 3). Furthermore, it was shown that that the chain length of PDA is short or it is long probably affects the sensibility of the biopolymer ingredient for ANARAITO detection by change of \*\*\*\*\*. With a certain ANARAITO detection implementation aspect, detection of small ANARAITO (for example, the cholera toxin of the *Vibrio cholerae* (*Vibrio cholerae*) origin, bacteriotxin like a pertussis toxin, and an antibody) was enabled by improvement of such sensibility. By further optimization, producing many reactions, a rearrangement, and the susceptibility ingredient for detection of ANARAITO is meant.

A. Arrangement of the polymerization possible radical in a monomer chain The chain length which locates a head radical in a specific distance from the polymer principal chain of the last polymer ingredient is dependent on the location of the polymerization possible radical in a non-gathered monomer. When using for ANARAITO detection in the case of diacetylene liposome, the thing of a monomer for which the liposome of gradually more high sensibility was generated is shown for the location of a diacetylene radical as the 18-20th place moves from between to the 3-5th place. Especially the liposome made from the monomer with the diacetyl radical of the 10-12th place to the 4-6th place can control sensibility efficiently. The diacetylene radical located in the about 5-7th place with a certain specific operation aspect like cholera toxin detection is desirable. The manufacture protocol of a monomer determines whether a diacetylene radical is arranged as which location of the last monomer product.

B. Total carbon chain length Although the total carbon chain length of a non-constituted monomer also influences the sensitivity level of a liposome product, the extent is smaller than the location of the polymerization possible radical in a monomer chain. Typically with the operation aspect which detects ANARAITO, shorter chain length gives large sensibility. Ideal for construction of this invention colorimetry liposome, although the range of a useful monomer is C12-C25 and it is sold at die length, according to this invention, both short chain length longer than it and is meant.

One of the desirable range of the monomer chain length of this invention is C20-C23.

The effect of the polymerization possible radical location on monomer chain length and a chain is proved by two or more experiments. It was shown by the example of 10 and 12-diacetylene derivative that C23 chain gives the last colorimetry liposome product discolored by ANARAI trebel lower than what made from the monomer with C25 chain. In the case of 5 and 7-diacetylene derivative, C22 merit's chain gave larger sensibility than C24 merit's chain. Thus, chain length is designed so that it may be suitable for the target optimal detection conditions.

III. dopant The biopolymer ingredient of this invention becomes unable to include one or more dopant (dopant) matter further. A dopant is included in order to change and optimize the physical properties of a

request of a biopolymer ingredient. Although such physical properties are not limited, they contain a colorimetry response, a color, sensibility, endurance, robustness, the adaptation over immobilization, temperature sensitivity, and pH sensibility. Although the dopant matter is not limited, a lipid, cholesterol, A steroid, an ergosterol, a polyethylene glycol, protein, A peptide or the film (for example, liposome and a thin film), and other combinable molecules for example, a surface active agent, polysorbate, the octoxynol, and sodium dodecyl sulfate -- A dipolar ion detergent, DESHIRU glycoside, a deoxycholate, a diacetylene derivative, Phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, A phosphatidyl methanol, cardiolipin, ceramide, cerebroside, Lysophosphatidylcholine, D-erythrosine GOSHIN, sphingomyelin, the dodecyl phosphocholine, N-BIOCHI nil phosphatidylethanolamine and other composition, or a natural cell membrane component is included. For example, if a sialic-acid derivatization diacetylene monomer is added to the liposome which comes to contain ganglioside and PDA, it will be proved [ aspect / with which an example 4 is provided / operation ] that a remarkable increment is brought to the colorimetry sensibility and quantum nature to detection of ANARAITO of a low. When the matter which has not been doped produces only a weak signal, amelioration of this colorimetry response using a dopant has convenience very much. While the target lipid (for example, lipid which ligand is contained or is a substrate of an enzyme reaction) is not carrying out a conjugated bond to a polymer principal chain (for example, ganglioside ligand), such a thing often happens. With a certain operation aspect, in order to change the color of a biopolymer ingredient, a dopant is added. For example, only from blue to red, from Orange from blue, the red from purple, Orange from purple, and green, since green, red and the liposome which changes to Orange also offer this invention. For example, the glutamine derivatization PDA generated the liposome of very dark blue (namely, almost black). green liposome was made from other operation aspects by the cycle of annealing (namely, about 80 degrees C -- heating) and cooling (namely, ordinary temperature) before the polymerization. A certain specific reaction has an advantage by the multicolor technique in the ability of the sensor which changes an ingredient into a certain unique color to be made.

Different dopant matter is combinable with single biopolymer ingredient preparation. For example, this invention offers the dopant cocktail which is the mixture of a glucose and a sialic-acid derivatization poly diacetylene component. The glucose component of dopant mixture can also reinforce sensibility so that it may achieve the operation which mainly prevents nonspecific adhesion on the front face of the liposome of this invention. It seems that the sialic-acid component combined with the poly diacetylene destabilizes a front face functionally, and increases the sensibility of ANARAITO detection remarkably. Both the singularity of adhesion and sensibility can be optimized without reducing the structure integrity of a biopolymer ingredient unnecessarily by using this \*\* dopant (co-dopant) technique.

Addition of a dopant reducing the activation barrier of color transition by not understanding the device for the purpose which uses this invention, although this invention is not limited (if ligand existing), and/or offering association between ligand and a joint principal chain, and enabling the reaction which carries out induction of the colorimetry transition is meant. The dopant in which one theory made clear during development of this invention has a big head radical (for example, sialic-acid derivatization lipid monomer) is a film rearrangement (membrane rearrangement) which receives various solvent interactions on a substrate front face, and a blue diaphragm structure destabilizes, consequently carries out localization. A shake (perturbation) small on the relative target which is alike and is given more becomes possible, and colorimetry transition is completed. The steric effect induction is carried out [ a steric effect ] by the molecular recognition phenomenon (namely, interaction with the biopolymer ingredient of ANARAITO or other molecules) blocks the head radical of a dopant, and other possible explanation to amelioration of the colorimetry response observed using a dopant with a big head radical is being able to spread the shake caused by ANARAITO.

With a certain specific operation aspect, a dopant comes to contain diacetylene or the corrected diacetylene (for example, sialic-acid derivatization diacetylene). In this example, it should be cautious of being used in order that the guided lipid may correct the physical properties of a biopolymer ingredient, and not being used for the recognition site for ANARAITO (for example, like [ of the example of the sialic-acid ligand used in order to detect an influenza virus ]) detection.

For example, the polymer ingredient of the diacetylene system only containing a sialic-acid derivatization monomer or a lactose derivatization monomer does not answer neurotoxin (for example, a kill RINUSU nerve toxin (botulinum neurotoxin)), but it is shown that it is inadequate for the interaction between

neurotoxin and a derivatization diacetylene lipid carrying out induction of the color change. However, when given with the ligand (for example, ganglioside GM 1) in which the same matter has compatibility to neurotoxin, the colorimetry response was detected in existence of neurotoxin. In this example, the lipid guided from a sialic acid and a lactose is a "dopant", and ganglioside GM 1 is ligand.

It is meant that extensive various dopant matter finds out an application to optimization of the physical properties of the biopolymer ingredient used with various operation aspects of this invention. Generally the matter which is the structure of natural cell membrane structure is useful as a dopant of this invention. For example, a steroid (for example, cholesterol) is the potential dopant which can give desired instability or stability to a biopolymer ingredient. Even if it is carrying out the polymerization also of the surface activity type compound to the self-assembly nature monomer which completes a polymer principal chain and it is not, either, a role can be played as a dopant. For example, it is shown that the detergent TWEEN 20 which does not contain a polymerization possible radical gives reinforcement very strong against the blue of the liposome of specific operation aspect with this invention. Other surface active agents which can be used as a dopant are peptide detergents (namely, small amphipatic molecule which has the canal field which simulates the \*\*\*\*\* (membrane spanning) field of membrane protein). It can join together in a biopolymer ingredient and these small peptides (it is 20 - 25 amino acid at die length typically) can change the stability or sensibility of a colorimetry response of an ingredient. Since \*\* is large in the canal field of an ingredient, a peptide detergent can have effect stronger against thin film stability or sensibility than many other surfactant molecules.

It depends for the most suitable percentage of the dopant combined with the structure of a biopolymer ingredient on the specific system developed and the need for a test condition. For example, since storage life is adapted for a long advantage or severe outdoor conditions, sensibility can reach a compromise to some extent. The percentage which a dopant can permit is limited only to the percentage which does not introduce sufficient association for the poly diacetylene molecule of an index to produce change of a required absorbance and a color theoretically, or the percentage which destroys the stability of polymer structure. The mole percentage of a dopant may change to 75% of high value to which the structure integrity of a biopolymer ingredient begins deterioration typically, if it is exceeded from 0.01% of low value from which the increment in sensibility is observed with a certain specific operation aspect. However, there may be specific operation aspect with it. [ the percentage of a dopant larger than 75% or and ] [ lower than 0.01% ] The desirable range of a dopant is 2% - 10%. With specific operation aspect with this invention, the optimal percentage of a dopant is about 5% (the example 4 and II knot reference). For example, in detection of a cholera toxin, lactose derivatization poly diacetylene (PDA) 2%, the thin film which comes to contain ganglioside 5% and PDA93% produced the color change in red from strong blue, when the incubation of the thin film was carried out with ANARAITO.

In case the suitable method of combining a dopant is chosen, the technical problem with which plurality competes and which should be taken into consideration occurs. for example, the acoustic wave bath (sonicationbath) for a certain specific liposome operation aspect production -- association is controlled very much by law and needs processing of several hours at it. The quiet joining-together method late on this relative target enables association of the complicated comparatively large or dopant matter. However, the acoustic wave bath technique is suitable only when meaning combining the dopant of a low percentage relatively. a point probe (point probe) -- law enables association of the dopant matter of a far high percentage typically at the shorter time amount for 1 - 10 minutes. However, this approach is typically limited to association of the dopant matter of smallness thru/or middle size. The temperature chosen for association is selected based on a specific analysis system and a desired liposome parameter. The expert could select selection of a parameter like pH, and a diluent, and other factors based on the specific system and the property of a request of a biopolymer ingredient.

The dopant molecule of a series of derivatization poly diacetylenes with a wide range physical characteristic was compounded. These dopants are not the same as the packing molecule typically observed by the biological film (namely, cholesterol, protein, a lipid, a detergent). It differs in that a function unique [ these ] to a given sensor system and specific is offered.

The design of two or more dopants which provide non-compounding implementation aspect with a specific function is indicated in the following and the example 4.

The easy system was designed so that a PDA molecule could be derivatized easily. This composition is shown in drawing 9 . Here, 10 and 12-pen TAKOSA gene acid are corrected to amine combination with a

molecule with the isolation amino group. Since all amino acid had an isolation amino group (a lysine has two amino groups), it has arranged 20 amino acid on the head of a PDA molecule, respectively.

Respectively, it has special physical properties and a derivatization PDA molecule can combine a special function with a biopolymer ingredient. For example, the matter which doped glutamine-PDA was the colorimetry sensor which whose sensibility is the highest, and has water solubility most, and was stabilized most. Some of physical properties of other amino acid derivatization PDA molecules are indicated in the example 4. The capacity which forms the water solubility, the thin film, and liposome to typical amino acid derivatization diacetylene, a color, and a colorimetry response are shown in drawing 10.

IV Ligand The biopolymer ingredient of this invention becomes unable to include one more or more ligands. Ligand can act as the recognition site of the biopolymer ingredient to ANARAITO, or support for taking in a molecule or making a biopolymer front face localize a reaction. With a certain operation aspect, by the interaction between ANARAITO and one or more ligands, destruction of the polymer principal chain of a biopolymer ingredient takes place, and detectable color transition is produced. It is desirable to check existence of a specific cleavage means object (cleavage means) (namely, ANARAITO) through such colorimetry change for detection of a lipid cleavage reaction. With a certain operation aspect, the living body polymeric materials which come to contain the ligand (for example, antibody to specific lipase) to a cleavage means object can be arranged within one device to the degree of the living body polymeric materials which detect the cleavage means object reaction itself (it indicated below). By this method, both existence of a cleavage means object and activity are detected by the single device.

It is made to connect with a self-assembly nature monomer by the connection arm, or can be made to be able to connect with a direct monomer, the matrix of a biopolymer can be combined before a polymerization process or in a polymerization process, or ligand can be made to adhere to a matrix (for example, to connect with the matrix component containing the head radical which combines ligand with ligand, or to pass other means) after a polymerization. For example, drawing 11 draws one operation aspect of this invention by the mimetic diagram. A compound 1 shows the ligand (namely, sialic acid) adhering to one end of a spacer molecule combined with an acceptor. Other ends of a spacer molecule have adhered to one of two or more of the monomers (for example, 10, 12-pen TAKOSA gene acid) by which the polymerization was carried out so that a color sensing element might be formed. A compound 2 shows 10 and 12-pen TAKOSA gene acid without adhesion ligand.

The ligand radical of this invention becomes unable to include the wide range matter. The main criteria are whether to have compatibility in ANARAITO which ligand chose. Although suitable ligand is not limited, it contains the organic molecule combined with a peptide, a carbohydrate, a nucleic acid, a biotin, a drug, a chromophore, an antigen, a chelate compound, a short chain peptide, pepstatin, the Diels-Alder (Diels-Alder) reagent, molecular recognition complex, an ion radical, a polymerization nature machine, a dinitrophenol radical, a linker radical, an electron donor or an acceptor, a hydrophobic group, a hydrophilic group, an antibody, or an acceptor. A biopolymer ingredient can consist of combination of the monomer which has not been connected or connected with ligand, in order to optimize a desired colorimetry response (for example, 5% ligand connection JIKOSAJINON acid (DCDA) and 95%DCDA). Furthermore, multiplex ligand can combine with a single biopolymer matrix. ANARAITO of very various groups is detectable so that clearly from the wide range ligand which can be used by this invention.

With a certain operation aspect, do not combine a self-assembly nature monomer with ligand, it is made to gather directly, and a polymerization is carried out, and it is used as a colorimetry sensor. Although such a biopolymer ingredient is not limited, it can find out an application to detection of ANARAITO of a certain specific class containing an volatile organic compound (VOC).

Ligand is combined in order to detect various pathogens with a certain operation aspect. Although not limited, HIV (Wies et al. and Nature 333:426 [1988]), Influenza (White et al. and Cell 56:725 [1989]), Chlamydia (Chlamydia) (Infect.Imm.57:2378[1989]), Meningococci (Neisseria meningitidis), streptococcus Switzerland (Streptococcus suis), Salmonella (Salmonella), mumps (mumps), Newcastle disease (newcastle) and reovirus (reovirus), The sialic acid for detecting various viruses containing Sendai Virus (Sendai virus) and myxovirus (myxovirus); Coronavirus (coronavirus), An encephalomyelitis (encephalomyelitis) virus, And the rotavirus (rotavirus) The 9-OAC sialic acid for detecting; a cytomegalovirus (cytomegalovirus) (Virology 176:337 [1990]) and a measles virus (Virology 172:386 [1989]) The non-sialic-acid glycoprotein for detecting; CD4 (Khatzman [ et al. ] and Nature 312:763 [1985]) for detecting HIV, A vasoactive intestinal tract peptide (Sacerdote et al. and J.of Neuroscience Research 18:102 [1987]), And the peptide T ()

[ Ruff et al., ] [ FEBS ] Letters 211:17 [1987]; a vaccinia The epidermal growth factor for detecting ; (Epstein et al. and Nature 318:663 [1985]) The acetylcholine receptor (Lentz et al. and Science 215:182 [1982]); Epstein-Barr virus (Epstein-Barr virus) which detects rabies and to accumulate The Cd3 assistant acceptor for detecting ; Beta-adrenergic receptor (Co et al., Proc.Natl.Acad.Sci.82:1494[1985]); RINOUIRUSU which detects reovirus and to accumulate (Carel et al., J.Biol.Chem, 265:12293 [1990]) ICAM-1 for detecting (rhinovirus) (Marlin et al. and Nature 344:70 [1990]), N-CAM, And the myelin joint glycoprotein MAb (Shephey [ et al. ], Proc.Natl.Acad.Sci.85:7743[1988]); the poliovirus acceptor for detecting a poliovirus (polio virus) () [ Mendelsohn et al., ] [ Cell ] 56:855[1989]; -- \*\*\*\* blast cell growth factor [ for detecting a Herpes virus (herpes virus) ] (Kaner et al. and Science 248:1410 [1990]); -- Escherichia coli (Escherichia coli) The oligo mannose for detecting; Ganglioside GM1; and wide range various pathogens for detecting meningococci (Neisseria meningitidis) for example, Neisseria gonorrhoeae (Neisseria gonorrhoeae) -- The antibody for detecting Vibrio vulnificus (V. vulnificus), the Vibrio parahaemolyticus bacillus (V. parahaemolyticus), Vibrio cholerae (V. cholerae), and Vibrio alginolyticus (V. alginolyticus) is included.

If it is this contractor, it will be possible to connect wide range various ligand types to the biopolymer ingredient of this invention. The method of derivatizing a lipid with the compound (for example, a carbohydrate, protein, a nucleic acid, and other chemical groups) of various range is common knowledge in this work. The carboxylic acid of the end of a lipid can be corrected easily and can make ester, phosphoric ester, the amino group, ammonium, a hydrazine, polyethylene oxide, an amide, and many of other compounds. These chemical groups give a carbohydrate, protein, a nucleic acid, and a joint radical with other chemical groups (for example, a carboxylic acid can be connected with direct protein by making activation ester, making it react with the proteinic isolation amino group continuously, and making an amide group form). The example of the antibody made to adhere to the Langmuir (Langmuir) thin film is common knowledge in this work (see Tronin et al., Langmuir 11:385 [1995]; and Vikholm et al., and Langmuir 12:3276 [1996]). There is a number many of other technique of carrying out coupling of the matter to the film, or combining the matter in the film. Especially Coupling to protein or the polymer film of a nucleic acid ; Coupling to a proteinic self-assembly nature organic monomolecular layer (see Bamford et al. and Adv.Mat.6:550[1994]) And association (for example, Downer et al., Biosensor and Bioelect.7:429[1992]) into the proteinic film is included (see Willner et al. and Adv.Mat.5:912[1993]). The protocol for making ligand (for example, protein, a nucleic acid, and a carbohydrate) adhere to the colorimetry matter of this invention is proved by the example 5.

For example, the approach of this invention offers the system which makes the protein molecule containing an antibody adhere to the thin film front face and liposome of the poly diacetylene easily, and offers the biopolymer ingredient which has "protein" ligand by it. Although such ligand is not limited, it contains a peptide, protein, a lipoprotein, a glycoprotein, an enzyme, an acceptor, a channel, and an antibody. If ANARAITO (for example, an enzyme substrate, acceptor ligand, an antigen, and other protein) is combined, destruction of the polymer principal chain of a biopolymer ingredient will take place, and change of a detectable color will be brought about. This invention means the protein ligand combined with the biopolymer ingredient, and them (for example, it connected with the surface head radical of the monomer of a biopolymer ingredient chemically) which were combined with the front face and chemistry target of a biopolymer ingredient.

V. Detection of colorimetry change Colorimetry change produced from destruction of a biopolymer ingredient is detectable by many approaches. With the desirable operation aspect of invention of this claim, the color shift was simply observed by visible observation. Therefore, the observer who is not trained like a home user can use this invention easily.

the nature spectrum which exceeds the limitation containing the optical density to specific illumination-light wavelength of easy visible observation with alternative operation aspect -- the spectrum of common knowledge in this industry in order to detect change -- a testing device is used. For example, the spectrum of the matter was measured before ANARAITO installation and to the back using the spectrometer, and the colorimetry response (%CR) was measured. The visible absorption spectrum of the ingredient before ANARAITO exposure was measured as  $B0 = I_x / (I_y + I_x)$  ("B" expresses the percentage of the given hue of the wavelength  $I_x$  in comparison with the reference wave length  $I_y$  among a formula). Then, after ANARAITO exposure, the spectrum was taken, same count was performed and  $B_{final}$  was determined. The colorimetry response was calculated as  $\%CR = [(B0 - B_{final}) / B0] \times 100\%$ .



Furthermore, if invention of this claim is a request, it can be applied to a transducer device. Association with the transducer of a self-assembly nature monomer ingredient An optical fiber (for example, Beswick and Pitt, J.Colloid Interface Sci.124:146[1988]; and Zhao and Reichert, and Langmuir 8:2785 [1992]), Quartz vibrator (Furuki and Pu and Thin Solid Films 210:471 [1992]; and Kepley et al., Anal.Chem.64:3191[1992]), And it is indicated using the electrode surface (Miyasaka et al., Chem.Lett., p.627[1990]; and Bilewicz and Majd, and Langmuir 7:2794 [1991]). However, unlike these examples, this invention offers the double-check (namely, ascertainment) by color change observation of an ingredient.

The living body polymeric materials of this invention can be coated with a certain operation aspect on the thin PzT ingredient which vibrates with resonance frequency, and can make a micro electromechanical system (microelectromechanical system (MEMS system)) from it. Thus, change of a biopolymer ingredient can be detected as colorimetry change with change of resonance frequency, and an event can be checked. Sensibility can also be reinforced by carrying out coupling of the lipid polymer to the photoelectric device which can be read on two or more specific wavelength, a colorimeter, or a fiber light chip. Moreover, a device is connected with a sound alarm or an alternating current signal generating device like vibration, and it can make it possible to interpret a signal simply.

the above-mentioned passage -- detection of the activity (for example, the lipid cleavage activity of lipase and film qualification activity of a transferase) of ANARAITO -- in addition, to detect existence of ANARAITO is also desired. The biopolymer ingredient of invention of this claim can be used in order to detect various ANARAITO containing a small molecule, a microorganism, a film acceptor, a film fragment, an volatile organic compound (VOC), an enzyme, a drug, an antibody, and other related matter by it, although not limited by observation of color change which takes place at the time of ANARAITO association. Invention of this claim offers the capacity to carry out under a very mild test condition and to detect a small living thing molecule in the condition near nature, and avoids the risk relevant to an alteration or decomposition of ANARAITO.

Detection of VI. film conformation change Invention of this claim offers how observation of colorimetry change detects change of the conformation in a biopolymer ingredient as above-mentioned. Change of such conformation may take place through chemical correction of the biopolymer ingredient by association with the ligand of ANARAITO (as mentioned above) and the chemical reaction (for example, enzymatic catalyst). With a certain operation aspect, invention of this claim offers the easy protocol using a biopolymer ingredient, detects an interface catalyst, identifies an inhibitor, and offers the practical technique which screens an enzyme and other catalyst matter (catalytic antibody), and makes a property decision of the catalytic activity. These approaches use a natural non-indicator substrate, and a catalyst or inhibition is signal-ized by the existence of color transition of the surrounding lipid polymer aggregate. Since this technique is a step, it can be conveniently used to high throughput screening of a compound. Generally this approach is applicable to the factor which affects enzyme recognition and activity and which reaches and influences film reorganization.

The mixed vesicle (mixed vesicle) which carried out the polymerization offers chemical and the convenient and economical alternative means replaced with the enzyme assay using the substrate which it is very stable to physical decomposition, and carried out the radioactive indicator. The vesicle stock solution indicated by this invention was stored without affecting an assay result six months or more.

Specific application of invention of this claim is indicated below, the extensive availability of this invention to change of the conformation of a certain range is explained, and the singularity and the ease of use are proved. Phospholipase A2, phospholipase C, phospholipase D, bungarotoxin, and other enzyme activity are explained. These examples mean only explaining the extensive availability of this invention, and do not mean that this invention is limited to such specific operation aspects.

I. Phospholipase A2 activity PLA2 activity is already studied using the indicator technique (for example, activity and fluorescence) about a polymerization vesicle (Dua et al., J.Biol.Chem.270,263[1995]), a micell (Reynolds et al., above-shown), and various model film systems like a monolayer (Grainger et al., above-shown; and Mirsky et al., and Thin Solid Films 284,939 [1996]). Invention of this claim offers the biopolymer ingredient incorporating the PLA2 substrate lipid for colorimetry detection of PLA2 enzyme activity.

Living body polymeric materials are the combination of a polymerization nature matrix lipid (for example, 10, 12-TORIKOSA gene acid) and the PLA2 substrate lipid (for example, dimyristoyl phosphatidyl choline [DMPC]) of various mole fractions (0 - 40%), and were prepared in the examples 1 and 10 as the publication.

With a certain operation aspect, the biopolymer ingredient containing a PLA2 substrate lipid was liposome shown in drawing 12. This drawing shows the DMPC substrate in the diacetylene lipid matrix before a polymerization (above figure) and after a polymerization (the following figure). the first condition -- a vesicle -- a naked eye -- \*\* -- it looked blue, and as shown in drawing 13 (continuous line), absorption maximum was seen near 620nm. When PLA2 was added to the DMPC/PDA vesicle, suspension changed to red quickly (namely, inside of several minutes), and as it showed drawing 13 (dashed line), it showed absorption maximum to about 540nm.

Color change was adjusted by changing the mole percentage of the natural lipid DMPC in a PDA vesicle, as shown in drawing 14. 10% or more of relative color change was observed clearly with the naked eye. The liposome containing 20% or more of DMPC showed the colorimetry response strong within several minutes. The colorimetry response which can also detect the liposome containing DMPC (for example, 5%) of a low mole ratio in visible after a still longer incubation was shown. The vesicle which does not contain DMPC almost remained after PLA2 addition with the blue phase, as shown in a contrast sample.

It is proposed that biotechnology clo MIKKU transition (biochromic transition) of a PDA vesicle and a film takes place from the shake (perturbation) of pi duplication which the conjugate polymer principal chain elongated. This structure rearrangement in which induction is carried out by previous research by penetrating to the inside of the PDA matrix of multiple-valued acceptor association or a peptide domain produces absorption of short wavelength (namely, 490-540nm) more (Charych et al., Chemistry and Biology, above-shown-an and Charych, and above-shown; and Cheng and Stevens, AdvanceMaterials, above-shown). A strong color change observed by the interaction between an enzyme PLA 2 and a mixed DMPC/PDA vesicle shows that an alternative path for chemical correction of the vesicle by the interface catalyst to carry out induction of the biotechnology clo MIKKU transition is offered in this example. Therefore, the new means which carries out induction of the colorimetry change in a biopolymer ingredient is proved [ invention / of this claim ].

PLA2 activity is measured independently using the indicator lipid analog incorporated into the PDA matrix in order to check that the biocatalyst has happened by the DMPC/PDA vesicle, and it could be made to perform coincidence measurement of product formation and a colorimetry response of a vesicle. The used analog is thioester 1 and 2-screw. - (S-decanoyl) It was -1 and 2-dithio-sn-sn-glycero-3-phosphocholine (DTPC). The cleavage of DTPC by PLA2 generated the 5 and 5'-dithio bis--2-nitro benzoic acid (DTNB) and the fusibility thiol qualification lipid which reacts immediately, and the coloring product which has [ 412nm ] absorption characteristic was generated (Reynolds et al., above-shown). When PLA2 was added to the DTPC/PDA mixing vesicle 40%, the hydrolysate actually produced absorption strong against 412nm, as it reacted with DTNB and was shown in drawing 15. As for the PDA vesicle, the color also changed to coincidence, and suspension showed the same colorimetry response as it of the vesicle containing DMPC shown in drawing 13. These results corroborated that the interface catalyst by PLA2 happened by the polymerization mixing vesicle.

The NMR experiment gave the information on the behavior of a real proof and an enzyme reaction product for occurrence of the interface catalyst by PLA2 further. Drawing 16 is before PLA2 addition (drawing 16 A) and after an enzyme reaction (drawing 16 B).

The description of 31P NMR spectrum of a \*\* DMPC/PDA vesicle is shown. Anisotropy 31P resonance (drawing 16 A) large in comparison from an unhurt vesicle corresponds to the choline head radical of DMPC embedded at the PDA vesicle. Observation of the 31P anisotropy of drawing 16 A shows that the DMPC molecule is being fixed in a vesicle matrix. After PLA2 addition, 31P signal was shifted to the lower part region, as shown in drawing 16 B. The location of 31P resonance of drawing 16 B is in agreement with the shift observed about the water solubilization RIZOMIRISUTOIRU phosphatidylcholine which is the hydrolysate of DMPC. Furthermore, drawing 16 B shows that 31P resonance observed in the suspension of the vesicle which carried out enzyme processing becomes remarkably narrow from 31P signal of the first DMPC/PDA vesicle origin, and drawing 16 A shows migratory [ of a phosphate group / higher ] after PLA2 catalyst (Smith and Ekiel, Phosphorous-31 NMR, Principles and Applications, Academic Press, Orlando, and pp 447 [1984]). This result suggests dissociation of the RIZO lipid reaction product after an enzyme reaction. OneH NMR data in which the appearance of the clear RIZO lipid phase after a reaction with PLA2 is shown supported this description further.

Phospholipase besides II. It was proved that the technique of colorimetry detection of phospholipase C (PLC) and the interface catalyst by other enzymes like phospholipase D (PLD) also having been attained



using the PDA vesicle which carried out substrate qualification, and having indicated it by this invention could generally apply. Although such phospholipases cleave the polar head radical field of a glycerophospholipid, phospholipase PLA 2 cleaves an acyl ester bond chiefly in 2-acyl location.

The assay trial of phospholipase D and C was carried out under the same conditions as PLA2 assay. Both PLD and PLC activity were detected by the success flesh side by liposome assay. PLD assay produced about 55% of last colorimetry response. However, the configuration of a response curve was looser than that of PLA2. Although it is not required to understand the device and it does not mean that this invention is limited by it in order to use this invention, the dynamics of PLD catalytic reaction differs or it is meant that the response time between a catalyst event and color change is more late. PLC assay produced 60% of last colorimetry response, and the response curve was the same as that of it of PLA2. Furthermore, existence of the interface catalyst by PLC and PLD was proved [ experiment / NMR ].

### III. bungarotoxin (BUTX)

beta-bungarotoxin which is the snake venom of the poisonous snake BUNGARUSU mull CHISHINKUTSUSU (*Bungarus multicinctus*) origin is known for destroying a synaptic vesicle and checking acetylcholine emission. It is classified as PLA2 toxin and this is two subunits :P It consists of 7.5-kDa subunits which share the 12-kDa subunit and protease inhibitor showing LA2 activity, and sequence homology.

Bungarotoxin, 40%DMPC / experiment according to 10 and 12-TORIKOSA gene acid (TRCDA) liposome 60% showed about 50% of maximum colorimetry response after the incubation of 1 hour. The response curve was the same as that of it of PLA2 assay. Furthermore, in BUTX, a color changes, the liposome after an incubation and in an assay solution is not a request, and precipitate was also produced. It was shown by previous research that BUTX guides fusion of small monolayer liposome (Rufini et al., *Biochemistry* 29, 9644 [1990]). It seems that it is dependent on BUTX, calcium<sup>2+</sup>, and the interaction between lysophospholipid although the device of fusion is still indefinite.

This bungarotoxin assay offers an example of a big molecular association object (molecular assembly) with an enzyme property with the capacity which generates colorimetry change of a biopolymer ingredient. With a certain operation aspect, probably, to apply an additional bungarotoxin detection property to a biopolymer ingredient is desired, in order to reinforce colorimetry detection. For example, the antibody (namely, ligand) to bungarotoxin can be added to DMPC, and it can include in a biopolymer ingredient. Thus, when bungarotoxin exists in a certain sample, ligand / ANARAITO interaction, and an enzyme / substrate reaction combine, and enhancement of a colorimetry response is offered.

Enzyme system besides IV. This invention will find out the application to detection, measurement, and property decision of the enzyme activity of many of other systems which especially contain stearylolytic enzyme, acyltransferases, protein kinase, glycosidase, isomerase, a ligase, polymerase, and proteinase, although it is not limited. Such an enzyme has separated in a solution or may be big molecule floc, a cell, and some pathogens. About general description of a biocatalyst event, the work (Dordick, *Biocatalysts for Industry*, Plenum Press [1991]) of dollar DIKKU is introduced.

For example, since the activity is measured, glycosidase is detectable as an index of the existence of a pathogen. Sialidase like neuraminidase is found out by the influenza virus and other sialidases are connected with Salmonella (*Salmonella*). By offering a biopolymer ingredient with the substrate for glycosidases, existence of a pathogen is detectable. A colorimetry sensor with very high sensibility is producible combining other sensing elements (for example, sialic-acid ligand for influenza virus detection).

The substrate which makes the detection system for proteinases can also be offered. For example, *Candida albicans* (*Candida albicans*) is detectable through the protease activity over a pepstatin substrate. The anthrax spore (anthrax spores) of the anthrax-bacillus (*Bacillus anthracis*) origin is also detectable by checking laccase activity through a reaction with a substrate. Laccases are a phenol, polyphenol, and an enzyme containing two or more copper which carries out the catalysis of oxidation inversion of various substrates containing aromatic amine. A specific substrate contains a BANIRU acid (vanillic acid), a syringe acid (syringic acid), and a 2-2'-AJINO-screw (3-ethyl-bends thio azo phosphorus-6-sulfonic acid). By introducing the laccase substrate of these one or more common knowledge into the biopolymer ingredient of this invention, the detection assay for anthrax spores is producible.

Other application contains the nest of the nucleic acid to the biopolymer ingredient top for examining nucleotide polymerase (for example, DNA polymerase) activity. These assay systems will find out the application on the technique of identification of a polymerase inhibitor, and property decision. It is clear that

the biopolymer ingredient of this invention finds out an application from these examples to a wide range film conformation change and colorimetry detection of a reaction.

V. Inhibitor screening Invention of this claim offers the approach for detecting the activity of the enzyme into which the conformation of the biopolymer film is changed, and other molecules as indicated above. These approaches are extensible to offering the exact and quick screening technique for identifying an inhibitor with the activity in connection with colorimetry change, and making a property decision (for example, by putting a candidate inhibitor to the biopolymer ingredient which comes to contain the protein substrate of an enzyme, a protease inhibitor is identified and a property decision is made).

For example, in detection of PLA2 enzyme activity indicated above, color change of a DMPC/PDA vesicle can be controlled by using the inhibitor to PLA2. 1 - When PLA2 was added in existence of a hexadecyl-3-trifluoro ethyl glycerol-2-phospho methanol (MJ33) (germanium RU et al., above-shown; and Jain et al., Biochemistry 30, 10256 [1991]), the vesicle remained with those blue phases. The difference of this color was clearly visualized in the PLA2/vesicle suspension of MJ33 existence in a microtiter plate (blue), and an absence (red) 96 well. Absorption of a well was measured using the standard microplate reader, and as shown in drawing 17, control of a colorimetry response was corroborated quantitatively. This drawing shows the colorimetry response curve to the DMPC/PDA vesicle [ in / (a continuous line, the 1.9% of the maximum errors) / the absence of an inhibitor ] in (a dashed line, a rectangular head, the 6.9% of the maximum errors) existence of MJ33. Inhibition of PLA2 by transposing calcium<sup>+2</sup> to Zn<sup>+2</sup> is also shown (a dashed line, a rhombus, the 6.5% of the maximum errors).

Nonspecific adhesion does not play a role in a biotechnology clo MIKKU response, but the inhibition by MJ33 of the color change from blue in red shows that PLA2 activity is concerned with direct color change. Removal of calcium<sup>+2</sup> whose inactivation of PLA2 is the catalyst cofactor (Gelb et al., above-shown) of PLA2 from a buffer solution is also observed. PLA2 which similarly was prepared in the buffer which contains Zn<sup>+2</sup> instead of calcium<sup>+2</sup> ion does not carry out induction of the color change in red from the blue of a vesicle, as shown in drawing 17 (a dashed line, rhombus). Neither of this vesicle changes a color also in existence of other enzymes like the lysozyme and glucose oxidase which obtain less than 5% of colorimetry response after a 1-hour or more incubation by the DMPC/PDA vesicle 40%. The singularity of a colorimetry response offers selectivity required for high throughput screening of enzyme inhibitor.

In order to screen an inhibitor, the living body polymeric materials containing the substrate of the enzyme examined are arranged in a multi-chamber device (for example, 96 well plate). each -- it incubates with the sample suspected to contain enzyme inhibitor in a well. Then, an enzyme is added and observation of color change is detected. It will prevent that an enzyme produces color change of a biopolymer ingredient partially [ an effective inhibitor ] or completely. In order to give dependability to a result, a suitable contrast sample (for example, having no inhibitor and the sample containing a known inhibitor) is applied to assay.

Catalyst of which VI. design was done The living body polymeric materials of invention of this claim offer further the approach of screening the protein "designed", a peptide, and the effectiveness and activity of a catalytic antibody. Especially making a specific solvent and an enzyme stable under heat conditions in engineering is performed briskly now. By giving a certain substrate to such an enzyme to the biopolymer ingredient of this invention, easy and exact screening of these protein made in engineering can be carried out by various test conditions. Similarly, using the approach of this invention, a catalytic antibody can be screened and a property decision can be made.

Immobilization of a VII. biopolymer ingredient Although the biopolymer ingredient of this invention is not limited, it is fixable on various solid-state base materials containing all separation media like polystyrene, polyethylene, Teflon, a silica gel bead, a hydrophobing silica, a mica, a filter paper (for example, nylon, a cellulose, and a nitrocellulose), a glass bead and a slide, gold and silica gel, sephadex (sephadex), and other chromatography media. With a certain operation aspect, a biopolymer ingredient is fixed to silica glass using a sol gel process.

Immobilization of the colorimetry biopolymer ingredient of this invention is desirable in order to improve the stability, robustness, storage stability, a colorimetry response, a color, the simplicity of use, the nest (for example, array) to a device, and the property of other requests. a certain operation aspect -- common knowledge -- use -- in order to make the same examining method as easy litmus paper, that of the colorimetry matter can be arranged to up to various substrate front faces. For example, the reflection property (reflective property) of a nylon filter paper greatly reinforces the colorimetry property of fixed poly diacetylene liposome. A filter paper also increases the stability of liposome by the mesh size. In other

examples, the ink cartridge of an ink jet printer is loaded with the liposome operation aspect of this invention, and it is used in order to print a biopolymer liposome ingredient in the paper like ink. The liposome matter which exists in the paper holds the colorimetry property. The ease which can produce a patternizing array in a desired configuration and size is proved [ aspect / this / operation ]. By using a multiplex cartridge (for example, color printer), a patternizing array is producible with various biopolymer ingredients.

A. Comprehension of the biopolymer ingredient by the sol gel process Since a sol gel process includes an organic molecule like a color and a living thing molecule in silica gel (entrapping), although it can use (For example) Non-Cryst.Solids [ Am.Chem.Sec.117:9095[1995];] 202:279 [1996]; [ Miller et al. and ] Avnir and Accounts Chem.Res.28.328[1995]; -- Yamanaka et al. -- And before reference and development of this invention, immobilization of self-organizing molecule floc (for example, a biopolymer ingredient, self-assembly nature monomer floc, and liposome) was not realized by the sol gel ingredient in Dave et al. and Anal.Chem.66.1120A [1994].

The operation gestalt of invention of this claim offers immobilization of the globular shape and bilayer lipid floc using the aqueous sol gel process with which a good result is obtained, and liposome. In the bottom of a water-solution condition, and ordinary temperature, although these molecular structure objects and especially the liposome that consists of biological or a living thing imitation (that is, nature is simulated) lipid are quite strong, existence of an organic solvent and an elevated temperature may decompose it easily. A sol gel process offers the easy approach which there is no structure alteration which is detected and fixes molecule floc, and produces the strong structure easily processed into desired size or a desired configuration. Sonication of tetramethyl alt.silicate, water, and the hydrochloric acid was carried out under cooling conditions until the single phase solution was obtained, and the sol gel ingredient of a silica was prepared. As long as use of a metallic oxide forms a transparent glass ingredient substantially [ they other than tetramethyl alt.silicate make comprehension easy, and ], it is meant by this invention. Although such a metallic oxide is not limited, it contains silicate, a titanate, an aluminate, ORUMOSHIRU (ormosils), and others. Then, the buffer was added to the acidic solution under cooling conditions. The living body polymeric materials produced as the publication above were mixed in this buffer sol solution. The desired shaping structure was filled with this composite, and it was made to gel in ordinary temperature. Since it is thought that it gets that various structures are applied in order to produce the desired size and the gel of a configuration containing the metal mold which makes the flat front face, the plastics, ceramic, or BADGE for making a cuvette and a thin film although not limited, it does not have the intention of this invention being limited by the shaping structure to be used. Since it has the intention of all the temperature requirements that make manufacture of functional ANARAITO detection gel easy, it does not have the intention of this invention being limited to gelation of ordinary temperature.

Although DCDA liposome was included in sol gel glass with one operation aspect, any nest of the biopolymer structure is meant in this invention. Gelation took place after the sol gel process indicated above and within several minutes, and purple gel was generated. The visible absorption spectrum of poly diacetylene liposome shown in drawing 18 was changeless in the sol gel matrix as compared with the liposome in a solution. After heating liposome at 55 degrees C, the thermochromic transition to red from the blue which is the description of the poly diacetylene ingredient took place. As shown in the spectrum of drawing 19, the matter which carried out hue change from blue to red was changeless similarly at the sol gel state as compared with the solution. Therefore, invention of this claim carries out compatible to the brittle living body polymeric-materials structure (namely, liposome), and offers the sol gel matrix which maintains the physical properties observed in a bulk solution.

Furthermore, it is meant that the sol gel preparation ingredient of various thickness has unique sensibility to ANARAITO. Since the pair (volume) ratio is so high that it is a thick film (front face), in order to make the cause of color transition, high-concentration ANARAITO is needed.

Furthermore, in order to make an ingredient with desired hole size, the gelation conditions of sol gel preparation can be optimized by changing setting temperature, a gel ingredient, and desiccation conditions. Also by changing the crosslinking density of an ingredient, hole size is controllable. this invention -- a hole several nanometers to hundreds of nanometers or more -- size is meant. the size of the matter which is not a request while a certain gel maintains access to the ligand of ANARAITO -- alternative screening is enabled. Moreover, although not limited by the sol gel technique, it becomes possible to form a cartridge, coating, a monolith (monolith), powder, and the structure in which it is fabricated in every configuration of the request

containing fiber, and deals.

B. Immobilization by the chemical bond A biopolymer ingredient can be combined with the film of Pori (ether urethane) or a polyacrylonitrile with operation aspect with this invention. These film is porosity and a hydrophilic property, and can be used for affinity separation or the immunodiagnosis. Carrying out coupling of the liposome of this invention to these film can combine IMIJZORIRU-carbonyl, a succinimide, FMP, or an activating group like isocyanate with the film first, and it can be performed by adding to the nucleophilic group (for example, -NH<sub>2</sub>, -SH, or -OH radical) to which the film exists in liposome promptly. Thus, the preparation object of every liposome containing these functional groups can be directly combined with the film. This technique is similar with coupling to the film of well-known protein in this industry (see Bamford et al. and Chromatography 606:19 [1992]).

Other immobilization technologies with various common knowledge in this industry can be used for the biopolymer ingredient of this invention. For example, the matter which has -SH functional group is also fixable to a golden front face, a particle, or an electrode through thiol golden association directly. In this case, with a pure golden front face, the solution of the liposome containing -sulfhydryl group is underwater, and stirs and carries out an incubation at a room temperature for 12 to 24 hours. Moreover, the matter is also fixable to a silicon chip or silica gel (for example, silicon dioxide) at an example 8 using the approach of a publication. Furthermore, the matter containing -NH<sub>2</sub> functional group is also fixable to a front face with the glutaraldehyde coupling reaction of the criterion often used by proteinic immobilization. Furthermore, liposome can be combined with the front face containing the polyethyleneimine which is branched polymer with an isolation amine radical through the carboxy group.

VIII. array The specific operation aspect with invention of this claim means production of the big pallet of the polymerization nature lipid which has various head radical chemistry, ligand, a dopant, a monomer, or other properties also in the property of other requests, and quality in a single device since selectivity, sensibility, quantum nature, the ease of use, and portability are increased. By using an array format, some advantages which conquer the fault of the single sensor technique are realizable. These use a sensor with partial selectivity and include the capacity which measures a multicomponent sample. This gives the capacity which senses a specific sample while an active jamming background exists, or acts to coincidence as the monitor of the sample of two or more purposes. For the purpose which produces the fingerprints in which a check characteristic of each sample is possible, the sensibility to the given sample of a given lipid can be determined. for example, existence of Sample X -- the lipid polymer film of the PDA derivative A -- perfect -- the Orange phase -- changing (%CR=100) -- it has %CR of 70, pink is produced, the PDA derivative C has %CR of 40, and the PDA derivative B produces purple, and the PDA derivative D does not have change of a color (are namely, still [ blue/still ] purple) -- \*\* -- it can carry out. Probably, Orange / pink / purple / purple-blue of response fingerprints show existence of Sample X. Clearly, the opportunity of a positive check to given ANARAITO is so high that the number of elements of an array is high. By fixing a biopolymer ingredient, the ingredient of which request size and a configuration can also be produced, and it can read small and easily, and can combine with the device which can be interpreted.

The array which measures both existence of a sample and activity is producible.

For example, although a part of array can offer the ANARAITO ability to detect to an enzyme when making a property decision of a certain specific enzyme (for example, thing incorporating the ligand which interacts with an enzyme), other parts offer enzyme activity assay (for example, thing included for the substrate for enzymes in a biopolymer ingredient). Such an array is extensible to that each part of an array is quantitative, or the use in the inhibitor screening technique of offering qualitative data or offering a control experiment. Experiment The following example is provided with specific desirable operation aspect and aspect with this invention for a real proof and the purpose explained further, and must not be interpreted as what limits the range of this invention.

In the indication of the following experiments ;N to which the following abbreviation is applied ;M (Convention) ; mM

(Mol) ;muM(micromole);mol(mol);mmol(millimol);mumol(micromole);nmol(nanomole);pmol(picomole);g (gram);mg(milligram);mug(microgram);ng(nanogram);l (Millimol) Or L(liter);ml(milliliter);mul(microliter);cm(cm);mm(millimeter);mum(micrometer);nm(nano meter);muCi(microcurie);mN (milli newton);

\*\* (angstrom);kDa(kilo dalton);ppm(1/1 million section);N(Newton);\*\* (whenever) Centigrade;

wt%(percent by weight);aq.(aquosity);J(joule);UV(ultraviolet);XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) ;P

DA (diacetylene monomer) ;P CA (pen TAKOSA gene acid monomer), DCDA ; TRCDA (Docosa gene acid) ; SA-PDA (TORIKOSA gene acid) ; BUTX ((PDA) Sialic-acid derivatization) ; OTS (Bungarotoxin) ; VOC (Octadecyl trichlorosilane) ; CR (Volatile organic chemistry matter) ; pH (Colorimetry response) ; EDC (Hydrogen ion concentration) ; AFM (Ethyl carbodiimide hydrochloride) ; Hz (Atomic force microscope) (Hertz);LB(Langmuir-BUROIETTO

(Langmuir-Blodgett));NHS(N-hydroxysuccinimide);CO<sub>2</sub>(carbon dioxide);MgSO<sub>4</sub>(magnesium sulfate);CdCl<sub>2</sub>(cadmium chloride);MeOH (methanol);

Be(beryllium ion);Mg(magnesium ion);calcium(calcium ion);Ba(barium ion);N<sub>2</sub>(nitrogen);Sigma (sigma chemical company ()) [ SigmaChemical Co., ] [ St.Louis ] MO) ;P erkin-Elmer Perkin-Elmer () [ Perkin-Elmer ] Co., Norwalk, CT;Fisher (Fischer scientific company ()) [ Fisher ] Scientific, Pittsburgh, PA,, and Farchan Laboratories (FARUKAN Laboratories (Farchan Laboratories, Inc., Gainesville.floor line)) ;P ark Scientific Instrument(Park scientific instrument company (Park ScientificInstrumen ts, Sunnyvale, CA));Biorad (Bio-Rad Laboratories ()) [ Bio-Rad ] Laboratories, Hercuies, CA;Gelman (Germain Saiensu-Sha (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)) ;P ierce(Pierce (Pierce, Rockford, Ill)); And Bellco Glass (Bercot Grass (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ)).

All the compounds were reagent grade purity, and as long as there was no notice, while it had been supplied, they were used. an organic solvent -- Fischer - scientific (Fisher Scientific)

since -- the spectrum which came to hand -- it was grade. All the water solutions were prepared using the water refined through the BAMUSUTEDDO deionization system (Bamstead Type D4700 NANOpure Analytical Delonization System) equipped with 18.0 M-Ohm-cm resistance and the registered organic substance removal cartridge (ORGANICfree cartridge).

Example 1 Preparation 1. of living body polymeric materials Manufacture of ribosome The self-assembly nature monomer included in liposome was dissolved in the solvent (it is a methanol chloroform and for gangliosides GM 1 for example, for diacetylenes). Although not limited, many of other volatile solvents containing benzene, a hexane, and ethyl acetate are used by this invention. The solvent solution was mixed by capacity suitable (namely, in order to prevent an optical interference in future desiccation processes) in a brown vial, and the total lipid content of desired lipid mixture (they are 5% of GM1 and 95% of diacetylene by the mol) and about 2micromol was obtained. Then, the solvent was twisted to rotation evaporation or it was made to evaporate by the nitrogen air current. The dry lipid was re-suspended in sufficient deionized water to make the lipid solution of 1-15mM. Then, for 15 - 60 minutes, by probe SONIKETA (Fisher sonicdismembrator model 300, 50% output, microchip), as nu (New, above-shown) indicated, sonication of the solution was carried out. During sonication, the solution was heated (in almost all cases, heat sufficient by just sonication is given), and was made into the temperature beyond the phase transition of the lipid to be used (typically 30-90 degrees C). or [ cooling at 4 degrees C for storage by filtering the produced mixture through the nylon filter (Gelman) of 0.8 micromole, or a 5mm Millipore filter (Millipoore Millex-SV filter) ] -- or the polymerization was carried out. With a certain operation aspect, before the polymerization, nitrogen was bubbled for 5 - 10 minutes through the sample, and the oxygen in a solution was removed.

The polymerization of the stirred liposome solution irradiated and carried out small 254nm ultraviolet lamp (a pen beam of light, energy:1600 microwatt/cm<sup>2</sup>) in the distance of 3cm in 1cm quartz cuvette. In order to replace all oxygen and to cool a sample, the chamber was purged with nitrogen during the polymerization. Therefore in 5 - 30 minutes, polymerization time amount was changed into the request property (for example, a color, polymerization degree) of liposome. the \*\* which does not purge a solution in an ultraviolet chamber with other operation aspects -- placing -- 0.3 - 20 J/cm<sup>2</sup> -- it was preferably exposed to the ultraviolet exposure of 1.6 J/cm<sup>2</sup> for 5 - 30 minutes.

With a certain operation aspect, the polymerization was carried out within the multi chamber plate (for example, ELISA plate). the liposome solution in which about 200microl carried out sonication -- a plate -- each -- a well -- it put in inside. The plate has been arranged in distance of 3cm between a plate and a lamp under an ultraviolet lamp. Irradiation time was typically continued for 1 minute. When the exposure was lengthened, pink / purple liposome was formed and it was shown that color change was started by ultraviolet radiation. Since a result with dispersion is given, such liposome should be avoided.

II Manufacture of a film The poly diacetylene film was produced all over the standard Langmuir BUROIETTO (Langmuir-Blodgett) trough (see Roberts, Langmuir Biodgett Films, Plenum, and New York [1990]). The trough was filled with water and the front face for films was made. The Millipore water purifier refined distilled water with the resistivity of 18.2 M-Ohm. The stratification of the diacetylene monomer (for

example, a 5.7-docosa gene acid, 10, 12 pen TAKOSA gene acid (Farchan Laboratories), 5, 7-pen TAKOSA gene acids, those combination, or other self-assembly nature monomers) dissolved into the solvent developer (for example, a spectrum grade chloroform [Fisher]) was carried out by the syringe on the water surface, and the continuation film was formed. The monomer prepared by the density range of 1.0-2.5mM was saved at the temperature of 4 degrees C in the dark place, and before using it in an experiment, it equilibrated to the room temperature.

When the layer was formed on the water surface, the film was physically compressed using the movable barrier to form the monolayer of the self-assembly nature monomer packed closely. The monolayer was compressed at the closest gestalt (until it reached the film surface pressure of 20 - 40 mN/m). The polymerization of the film was carried out after compression. The specific operation gestalt (for example, example using a dopant) with this invention will make required about surface pressure compression of 20 - 40 mN/m.

Although the polymerization of the monomer was carried out using the ultraviolet exposure, other means (for example, gamma irradiation, X-ray irradiation, and electron beam exposure) of a polymerization can be used. The pressure on a film was maintained to the surface pressure of 20 - 40 mN/m through the exposure process by the movable barrier.

The ultraviolet lamp separated from the film and the trough 20cm or more, and was placed. If the lamp was closer to the film, it turned out that damage may take place to a diacetylene film according to the film heating effectiveness. The film was exposed to ultraviolet radiation with a wavelength of about 254nm for about 1 minute. The polymerization was checked by observing the blue obtained at the time of the formation of diacetylene which carried out the polymerization, and detecting the muscle of typical linearity on a polymerization diacetylene film with a polarization optical microscope.

III. Manufacture of tubing As liposome was indicated above, it dissolved in the solvent and mixed together, and it evaporated and the self-assembly nature monomer for including in tubing (tubule) was re-suspended underwater. Although 1 - 10% of ethanol was added to this solution by capacity, other organic solvents are meant in this invention. Then, as liposome was indicated above, the polymerization of the solution was cooled [ it carried out sonication (heating as occasion demands), filtered it, and ] and carried out.

Example 2 Trial I of living body polymeric materials Optical microscope detection method and X-ray spectroscopic analysis The diacetylene film was prepared at the Langmuir-BUROIETTO trough (trough) as mentioned above using the combination of a PDA monomer and a sialic-acid derivatization PDA monomer. With the level contact process (horizontal touch method), the floating polymerization assembly (floating polymerized assembly) was raised on the glass slide beforehand covered with the self-assembly nature monomolecular layer (monolayer) of octadecyl trichlorosilane (OTS), as indicated (Maoz and Sagiv, J.Colloid Interface Sci.100:465[1984]).

Subsequently, the slide was examined using the rectangular polarizer, as indicated by optical microscope detection method (Day and Lando, and Macromolecules 13:1478 [1980]). The film showed the high order more than the macroscopic range (namely, 50-150microM) as shown in the optical microscope photograph of drawing 20 . The big domain below 150microM was visible (1cm=10microM).

The film was further characterized by the angular resolution X-ray-photoelectron-spectroscopy analysis method (XPS) and ellipsometry. The result of XPS showed that the amide nitrogen atom and carbonyl carbon atom of a head radical had localized on the front face compared with the methylene carbon of a lipid chain. This shows that a SHIAROSHIDO head radical exists on the surface of a film. About 40A film thickness was shown by elliptically-polarized-light analysis of the poly diacetylene monomolecular layer which covers HF-processing silicon top, and this was in agreement with the forecast based on molecular modeling.

II Atomic force microscope detection method The morphology of a microscopic biopolymer crystal, surface topography, growth, and a dissolution property were clarified using in situ atomic force microscope detection method, dynamic observation of the nucleation event was carried out, and it was measured. Research was done using the standard technique for in situ research, as indicated by Binnig and others (Binnig et al., Phys.Rev.Lett.12:930[1986]; and Binnig et al., Europhys.Lett.3:1281[1987]).

Two different atomic force microscope detection method was used for this research. The image bigger 1 micrometer than 2 was obtained using the commercial instrument (Park Scientific Instrument). In this case, Si ultra lever (ultralever) (Park Scientific Instrument) was used. By using the glass slide (Bellco Glass) which was able to be burned in the pattern by the commercial photolithography method, the same exact field



of a film was able to be imaged after each temperature process. The elephant smaller 1 micrometer than 2 was obtained using its own AFM (Kolbe et al. and Ultramicroscopy 42-44:1113 [1992]). The Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> cantilever (cantilevers) of nominal force constant 0.1 N/m was used (Park Scientific Instrument). Both microscopes were able to be operated in contact mode and, in the case of the latter, bending of a cantilever and a twist were able to be measured to coincidence with 4 mulberry DORANTO location high sensitivity (four-quadrant position-sensitive) photodiode. All images were obtained in contact mode under ambient conditions.

**Example 3 Optimization of a biopolymer ingredient** This invention offers the ecology polymeric-materials gestalten (for example, liposome, a film, tubing, etc.) which were fixed to various gestalten using various ligands, without using dopant material and from which versatility differs using dopant material. About each of these operation gestalten, sensibility, robustness (robustness), a colorimetry response, and other desirable factors can be made into max by optimizing a biopolymer ingredient. Some examples explaining such optimization are shown below. These examples are for only explaining the flexibility of this invention. This invention is not limited to these specific operation gestalten.

**I Mixed monomer** The living body polymeric materials of this invention may contain the sample of a pure monomer (for example, pure diacetylene), and may contain a mixed monomer (for example, PDA containing ganglioside GM 1 or a dopant). The biopolymer ingredient which has a desired property can be obtained by optimizing the percent presentation of a mixed monomer. The example of such optimization is shown below about detection of ANARAITO (namely, cholera toxin) which has ganglioside ligand.

In order to evaluate the colorimetry response of a GM1/PDA film, it is ligand (namely, GM1).

The combination of the various concentration of PDA was examined. When there were too (that is, the concentration of a polymerization lipid is low) many ligand molecules to add, the film was unstable and its bag ground was high. When a film contains many polymerization lipid molecules too much, a film is too unstable and color change does not fully produce it. In investigation of the GM1/PDA biosensor constituent which has the capacity which shows the maximum response, a series of PDA monomolecular-layer films were moved to the OTS covering glass slide. It evaluated by putting a film to a cholera toxin, and the colorimetry response was measured using the UV-visible spectral-analysis method. The colorimetry property of GM1 biotechnology sensing monomolecular-layer film and response which were studied in these experiments that show the colorimetry response which answered the inside of an initial absorbance, a movement ratio (transfer rate), and the buffer solution and ANARAITO are summarized to drawing 21. Initial absorbances (A<sub>init</sub>) are the passing speed of a film, and the function of a presentation reflecting all encompassing of the film in 640nm. Generally GM1 which does not give a color functional group (chromatic functionality) to a mixed assembly decreases early blue reinforcement. A movement ratio is the rate of the area which decreased on the tough front face, and the area of the substratum (substrate) which appeared in the low order phase (subphase), and a PDA film shows that migratory is high in comparison with the thing of sialic-acid-PDA (SA-PDA) and GM1 molecule. The colorimetry response (CR) to red from blue shows that low CR is shown in the buffer solution, except when a monomolecular-layer film uses GM1 of a high content, or SA-PDA.

**II Optimization of a low order ion phase (subionic phase)** The ion content of an aquosity low order phase has significant effect on the property of the Langmuir monomolecular layer. The electrostatic interaction of the monomolecular layer which has an anion head radical by existence of a cation kind is strengthened, and, as a result, a film is stabilized (Gaines, Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interface, Interscience Publishers, New York, pp 291-299 [1966]). The constant-temperature line of PDA is shown in drawing 22 as a function of the low order phase concentration of CdCl<sub>2</sub> 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%. Shifting an expansion phase (expanded phase) in the direction of a low-molecular field systematically as the concentration of Cd<sup>2+</sup> rises, this shows that a monomolecular layer is stabilized by high-concentration Cd<sup>2+</sup>. This behavior has the large place based on the ionic interaction of the anion nature carboxylate head radical (electric dissociation exponent\*\*5) dissociated partially [ Cd<sup>2+</sup> and PDA ]. On the other hand, acid SA-PDA and GM1 (the sialic acid of these molecules electric dissociation exponent\*\* 2.6) also contribute to probably strengthening the operation. The further proof about the device which monomolecular-layer stabilization requires is seen in increase of the surface pressure as a function of high ion concentration. It is shown that many divalent ion (Be, Mg, calcium, Ba, and Cd) affects the constant-temperature line of a PDA monomer by salt generation, and this salt generation affects packing of the molecule on the basis of the magnitude and the charge of ion. The immiscible inclination was not observed to the three-component

system of 1/5% SA-PDA of 0.015%GM in the aqueous low order phase containing M or less  $\text{Cd}^{2+}$  / 90%PDA. It is shown that this mixed monomolecular layer is comparatively stable about an ion content as for this. However, when  $\text{Cd}^{2+}$  increased to 0.1M, behavior with an unstable PDA monomolecular layer was observed 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%. This may be what is depended on a condensation domain generating as a result of precipitate with that the capacity of an interaction with  $\text{Cd}^{2+}$  differs between the sialic acid in SA-PDA, GM1 in PDA, and a carboxylic acid, or high salt concentration.

By low  $\text{Cd}^{2+}$  concentration (namely, about  $10^{-4}$  M), the constant-temperature line is hardly different in a condensed phase field, and this shows that the ion of a low content in a low order phase does not have significant effect on the structure of a compact film. When the concentration of  $\text{Cd}^{2+}$  rises more than  $10^{-3}$ M, the shift of the molecule field of a condensed phase field arises as shown in drawing 22, and this shows a certain structural change in a compact monomolecular layer. In order to investigate the role of the additive in the mixture to induction of such a structural change, the constant-temperature line of pure PDA in  $\text{Cd}^{2+}$  of  $10^{-2}$ M was measured. In the  $\text{Cd}^{2+}$  low order phase of  $10^{-2}$ M, a rapid rise is observed in the constant-temperature line of PDA in a low-molecular field. However, the inclination of the constant-temperature line in a compact field and a molecule field was essentially the same as the case of water. Such a result is in agreement with the regular film in high salt concentration, and this film property is mainly prescribed by the long hydrophobic part of a molecule.

The same result was obtained about the diacetylene formed into the amine radical (amine based) (Walsh and Lando, Langmuir, 10:252 [1994]). Therefore, reflecting the mixed electrostatic effect guided by each component which dissociated the shift of drawing 22 separately in the film, this shows that stability is low, when a 3 component film compares with a pure PDA film.

III Optimization of the low order phase pH About the acid molecule PDA, ionization of a PDA molecule arose by the rise of pH, consequently the substantial charge was guided in accordance with the monomolecular-layer interface. The constant-temperature line of 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%PDA in pH 4.5, 5.8, and 9.2 is shown in drawing 23. By high pH (pH9.2), the film has expanded considerably as a result of the electrostatic repulsion between adjoining PDA molecules. It is difficult to compress this film and to make a monomolecular layer form. Furthermore, a segment with each separate molecule is observed and this shows the immiscible inclination in a mixed monomolecular layer with the inclination which forms the separated domain. Clearly, the interaction which is not desirable was made in the aqueous front face by the high density of electric charge in a monomolecular-layer interface. It may be expected that it is not desirable to add compounds (namely, acid thing), such as GM1, by this pH into PDA mixture. The constant-temperature line of the three-component system in low pH shows normal peak behavior. \*\*\*\*\* is more nearly intentionally [ than Neutrality pH ] large, and this shows that a more stable film is formed in low pH. Control of ionization of the PDA molecule in this pH can be contributed to increase of film stability, and can stabilize [ consequently ] the nest of GM1 molecule of a PDA film.

IV Optimization of low order phase temperature During manufacture of a film, if temperature is raised, surface pressure will become high, an expansion field will be expanded, and the shift of the phase transition point to the direction of a low-molecular field will usually arise in the  $\pi/A$  constant-temperature line (Birdi, Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces, Plenum Press, New York [1989]). It is generated from the flexibility in which the hydrocarbon tail of a hot lipid is high as a result of heat stirring, and this effectiveness can be analyzed using 2-dimensional Clausius-Clapeyron equation (as it is Birdi and the above). However, the monomolecular-layer film containing PDA receives film crushing during compression typically. Therefore, evaluation of a low order phase temperature effect needs to take this phenomenon into consideration. The temperature effect in the constant-temperature line of PDA is shown in drawing 24 100%PDA, 5%SA-PDA/95%PDA and 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%. Surface pressure increased and the form of the constant-temperature line changed as low order phase temperature decreased. In the constant-temperature line in low temperature, the liquid-solid phase transfer characteristic became greatly so that might be shown by generating of the smooth curve in disappearance and the transition field of a peak, as and. All the  $\pi-A$  constant-temperature lines obtained about three monomolecular layers show the same property. The main differences between these drawings are the locations of a squeezing point, and this is the function of a film presentation.

V Location of the polymerization nature machine of a monomer The effectiveness of the location of the polymerization nature machine in a self-assembly nature monomer was measured by comparing the colorimetry response of 10 and 12-pen TAKOSA gene acid liposome to ANARAITO, and 5 and 7-docosa



gene acid (from Alice Deckert of Holy Cross college to donation) liposome.

GM1 ligand was included in the liposome of each mold, and detection of a cholera toxin was analyzed. Ganglioside GM 1 was mixed with the diacetylene "matrix lipid" monomer at five-mol%. Liposome was prepared using the probe sonication method and the polymerization was carried out by UV irradiation (254nm).

the joint en-Inn (ene-yne) principal chain of poly diacetylene liposome -- seemingly -- \*\* -- the blue/purple solution was obtained. The newly prepared visible absorption spectrum of purple liposome is shown in drawing 25 . When a cholera toxin is added to GM1 and the liposome which consists of 5 and 7-docosa gene acids 95% 5%, a solution changes to orange immediately, and "red phase" absorption of the poly diacetylene occupies dominance as shown in drawing 26 .

When ganglioside GM 1 was mixed with the matrix lipid which comes to contain 10 and 12-pen TAKOSA gene acid instead of 5 and 7-docosa gene acid, the colorimetry response was reduced intentionally.

Although he does not need to understand the device although this invention is used, and he does not plan to limit this invention such, it is thought that increase of the sensibility observed by 5 and 7-docosa gene acid liposome is what produces an optical reporter radical from arranging near the interface more (3 methylene units [ as opposed to / Namely, / 8 methylene units ]). The small rotation about the C-C association beta to a polymer principal chain appeared in changing efficient bond length enough, and a certain thing was shown by Fourier transform IR spectral analysis (Berman et al. and Scienc 259:515 [1995]). Change of such conformation is more simply changed by shorter alkyl chain length.

Example 4 The nest, optimization, and the property of a dopant Whenever it designs a new sensor system, the amount of PDA, DOPANDO, and ligand (for example, ganglioside) is changed, and the optimal sensor is made. Although 0 - 100% of amount is typically used to a trial, as for the optimal system, it is clear to use 5 - 15% of ligand, 0 - 95% of PDA, and 0 - 95% of dopant.

It depends for the rate of each component on a system, required stability, and required sensibility. With a specific operation gestalt with this invention, the dopant of one or more molds may be included in a biopolymer ingredient.

I Nest of the dopant to living body polymeric materials The amino acid derivatization diacetylene dopant was included in colorimetry liposome. The lipid (namely, a dopant and a diacetylene monomer) was first dissolved in chloroform, and the aliquot was moved to the reaction vial. By using N2 gas, the organic solvent was blown away, a suitable quantity of water was added, and lipid concentration was set to about 1 mM. Liposome was formed by destroying white precipitate using bath sonication. Typical sonication time amount was changed in 1 hour - 5 hours depending on the class of dopant to be used. Temperature was carefully raised to about 80 degrees C during sonication, and generation of liposome was promoted. Sonication was continued until the solution became transparence. The impurity which may filter a hot solution immediately with the Millipore Millex-SV filter of 5microM, and may exist in a solution was removed. The obtained solution was kept at 4 degrees C before use overnight.

after a polymerization and \*\* -- blue liposome was obtained. Final liposome contained the amino acid derivatization diacetylene dopant.

II Optimization of dopant concentration Detection of a cholera toxin was indicated by I term of an example 3, and the film including PDA, GM1 (namely, ligand), and the sialic-acid derivatization PDA (namely, dopant) was made and produced. It was shown by colorimetric analysis that all three components are required for the optimal colorimetry response. For the optimal detection of a cholera toxin, it is required for both SA-PDA and GM1 to exist in a film, the film is very unstable depending on the concentration of all three components, or a color is not fully changed. Although he does not need to understand the device although this invention is used, and this invention is not limited such, it is thought that the function of SA-PDA is what offers the metastable state of a film to biomolecule recognition by the stress induction machine style (Charych et al., Chem.and Biol.3:113[1996]). The film which consists of PDA 1/1% SA-PDA of 1%GM / 98% was also investigated. It turned out that CR is low and the useful colorimetry biosensor was not obtained. As shown in drawing 21 , it was checked that the optimal colorimetry sensors are 1/5% SA-PDA of 5%GM / 90%PDA. Therefore, the best sensor is obtained by dopant SA-PDA of a mol content to detection of a cholera toxin 5%.

III Property of a derivatization diacetylene dopant The stability of the stability of a biopolymer ingredient and a film, or liposome can be reduced by using the hydrophobic amino acid connected with diacetylene. In order to tune finely two factors connected directly mutually, i.e., stability, and sensibility, these

derivatization PDA is useful in the assembly of a complicated system, and is obtained. By using the hydrophobicity PDA including a hydrophilic property PDA, the stability of a film and liposome can greatly be raised under various environmental conditions. Sensibility is sacrificed although increase of stability is observed. It is necessary to optimize the balance of sensibility and stability.

The solubility of an ingredient can be raised by using the acidity and basic amino acid which were connected with diacetylene. That is, the poly diacetylene lipid is mixable with water-soluble biomolecule with such change. Usually, not water solubility but an organic solvent is required for PDA (that is, to biomolecule, it is harmful and obtains). By arranging acidity or a basic head radical on a PDA molecule, the solubility of Derivatization PDA was greatly raised. Moreover, these results that they made produce a very bright color and were more stable in the assembly of a sensor were what is depended on homogeneous increase of mixing between water solubility and all components. The acid / base PDA was amino acid induction diacetylenes with very large sensibility.

By combining a histidine with the amine association PDA, the ingredient reproducible although a color may change easily was made. Although Polymerization PDA changes a color, I hear that the specific advantage about this approach cannot be used again, and it usually has it. This advantage is acquired by electric dissociation exponent near [ about the head radical of a histidine ingredient ] neutrality.

By arranging a fluorescence PDA head radical on PDA amine coupled systems, the colorimetry biosensor with which the fluorescence property was added can be manufactured. This offers multiple-purpose and a high sensitivity sensor.

Example 5 Association of ligand Covalent bond of the ligand may be carried out to the head radical of a self-assembly nature monomer, or (for example, sialic acid connected with the diacetylene monomer) covalent bond may be carried out to the front face of a polymerization ingredient, or (for example, the protein and the antibody which have many amines and thiol association to an ingredient front face) it may be included in a biopolymer ingredient in noncovalent bond (for example, ganglioside included in a film and the film of liposome).

A self-assembly nature monomer may be compounded so that the chemistry head radical functionality of an extensive class may be included using a general synthetic technique by this technical field. In some embodiments, ligand is combined with a self-assembly nature monomer by carrying out a chemical reaction to these functional groups using the well-known synthetic approach by this technical field. As a functional group, although it does not limit, ester, the ether, amino, an amide, thiols, or those combination are mentioned. On the other hand, it may be included in a self-assembly nature matrix, without much ligand carrying out covalent bond to a surfactant (for example, membrane protein and a molecule with a hydrophobic field like ganglioside and a lipoprotein).

In order to explain the ligand of the extensive class which may be connected with the biopolymer ingredient of this invention, the specific application of this invention is indicated below. These examples are for only explaining the extensive applicability of this invention, and do not limit this invention to these specific embodiments.

I Sialic acid It was made to combine with a diacetylene monomer by making a sialic acid into ligand. Some well-known synthetic approaches can be used by this technical field. The many have general applicability to association of the carbohydrate to the biopolymer ingredient of this invention. PDA (inside of 1.0g, 2.7mmol, and chloroform) was made to react in one embodiment with N-hydroxysuccinimide (NHS) (0.345g, 3.0mmol) and a 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC) (0.596g, 3.1mmol). The solution was stirred for 2 hours and chloroform was evaporated after that. Diethylether and water extracted residue. The organic layer was dried and filtered with magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>). Subsequently, the solvent was evaporated by the rotary evaporator and 1.21g N-succinimidyl-PDA (NHS-PDA) was obtained. ethanolamine (0.200ml, 2.9mmol) -- the solution (solution which melted 1.21g with 50ml chloroform) of NHS-PDA -- in addition, triethylamine (0.350ml, 2.5mmol) was added after that, and it stirred at the room temperature for 2 hours. 0.99g N-(2-hydroxyethyl)-PDA was obtained by evaporating a solvent and refining residue with a silica gel chromatography (2:1 EtOAc: a hexane, R<sub>f</sub>=0.15).

It was dropped stirring having tetraethylene glycol applied [ which was melted with 25ml chloroform ] it to the solution which melted N-succinimidyl-PDA (0.603g, 1.28mmol) with 20ml chloroform 30 minutes or more (1.26g, 6.60mmol). After stirring reaction mixture for 30 more minutes, evaporation by the rotary evaporator removed the solvent. It dissolved in EtOAc and residue was extracted twice with water. The organic layer was dried by MgSO<sub>4</sub> and the rotary evaporator removed the solvent. By refining an extract

with a silica gel chromatography (20:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH, R<sub>f</sub>=0.20), 3.72g N-(11-amino - 3, 6, 9-trio KISHIUN deca nil)-PDA was obtained.

It added to the cooling solution which melted the 2ml acetic anhydride to the ethyl-5-N-acetyl -2 and 6-anhydro -3, and melted 5-dideoxy-2-C-(2-propenyl)-D-erythro-L-MANNONONONETO (mannonononate) (0.47g, 1.30mmol) to the 1.7ml pyridine, stirring under nitrogen. Reaction mixture was warmed at the room temperature overnight. The rough viscosity oil was obtained by removing with ambient temperature under reduced pressure of a solvent 18 hours after. It was made to crystallize by repeating the oil and evaporating it from toluene. It applies to the flash chromatography on the silica using ethyl acetate by making a rough solid-state into an eluate, and is 0.58g ethyl-5-N-acetyl - 4, 7, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, and 5-dideoxy-2-C-(2-propenyl)-D-erythro-L-MANNO-NONONETO were obtained.

It is ethyl-5-N-acetyl to acetone 10ml. - It cooled at -78 degrees C, protecting from moisture 4, 7, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, and the solution that melted

5-dideoxy-2-C-(2-propenyl)-D-erythro-L-MANNO-NONONETO (0.38g, 0.72mmol) using a CaCl<sub>2</sub> desiccation tube. The solution was made to attract ozone until the blue which is the description continued for 5 minutes. Reaction mixture was purged by O<sub>2</sub>, stripping of the superfluous O<sub>3</sub> was carried out, and it warmed at 5 degrees C after that. The superfluous Jones reagent (seven drops) was added until the red lamp color continued, and subsequently reaction mixture was warmed to ambient temperature. Ethanol was dropped after several minutes and the superfluous oxidizer was consumed. Green precipitate was filtered and the acetone washed several times. Vacuum concentration of the filtrate was set and carried out, and it dissolved in ethyl acetate. Saturation NaHCO<sub>3</sub> water solution extracted the solution 3 times. The water layer was doubled, it was made acidity by dark HCl, and the methylene chloride extracted 5 times. It is ethyl-5-N-acetyl by setting a methylene chloride extract, drying, and filtering and carrying out vacuum concentration by MgSO<sub>4</sub>. - 4, 7, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, and 5-dideoxy-2-C-(acetic acid)-D-erythro-L-MANNO-NONETO (manno-nonate) were obtained.

Ethyl-5-N-acetyl - 4, 7, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, and 5-dideoxy-2-C-(acetic acid)-D-erythro-L-MANNO-NONETO (0.194g, 0.35mmol) were added to the cooled solution (5 degrees C) which melted NHS (0.058g, 0.50mmol) and EDC (0.096g, 0.50mmol) with 2ml chloroform under nitrogen. It warmed to ambient temperature for 5 hours, stirring reaction mixture. Subsequently, reaction mixture was diluted with 15ml chloroform, it washed by 1-N HCl (water solution), and saturation sodium bicarbonate (water solution) washed once with the saturation sodium chloride (water solution) twice. It is ethyl-5-N-acetyl by drying, and filtering and condensing an organic layer by MgSO<sub>4</sub>. - 4, 7, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, and 5-dideoxy-2-C-(N-succinimidyl acetate)-D-erythro-L-MANNO-NONONETO were obtained.

Ethyl-5-N-acetyl - 4, 7, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, 5-dideoxy-2-C-(N-succinimidyl acetate)-D-erythro-L-MANNO-NONONETO (0.143g) 0.22mmol(s) and N-(11-amino - 3, 6, 9-trio KISHIUN deca nil)-PDA (0.133g, 0.24mmol) were dissolved in 2ml chloroform, reaction mixture was sealed, and it stirred for 56 hours. The solution was diluted with 15ml chloroform, it washed by saturation 1N HCl (water solution), and saturation sodium bicarbonate (water solution) washed once with the saturation sodium chloride (water solution) twice.

The rough semisolid was obtained by drying, and filtering and condensing an organic layer by MgSO<sub>4</sub>. This matter is covered over the flash chromatography on a silica (20:1 CHCl<sub>3</sub>:MeOH), and it is ethyl-5-N-acetyl - 4, 5, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, and 5-dideoxy-2-C-[(N-11'-(PDA)-3', 6', 9'-trio KISHIUN deca nil) ASEDAMIDO (acedamido)]-D-erythro-L-MANNO-NONONETO were obtained.

A 0.1g sodium hydroxide 4ml dissolved water To a 0.5ml methanol, and the ethyl-5-N-acetyl -4, 5, 8, the 9-tetra--O-acetyl -3, 5-dideoxy-2-C-[(N-11'-(PDA)-3', 6', 9'-trio KISHIUN deca nil) ASEDAMIDO]-D-erythro-L-MANNO-NONONETO (0.20g) The sialic-acid induction PDA was made to form by melting 0.19mmol(s). The solution was stirred for 3 hours, and ion exchange resin (Biorad AG 50 W-X4 H<sup>+</sup> object) was added until the solution became acidity with the pH indicator paper. The solution was filtered, vacuum concentration of the filtrate was carried out, and the sialic-acid induction PDA was obtained.

II Carbohydrate In other embodiments, N-allyl compound glycoside can be manufactured by embellishing carbohydrates (namely, sialic acid etc.) by the three-stage method. Subsequently, N-allyl compound glycoside can be connected easily [ other molecules (for example, PDA) ] using a well-known simple chemosynthesis method by this technical field. This approach offers the means for building an extensive

carbohydrate into a biopolymer ingredient (the means for therefore detecting extensive ANARAITO is offered). An oligosaccharide is dissolved in raw allylamine (neat) (water may be added when it does not have a bad influence on yield if needed), and 0.5 - 0.1M solution is manufactured [ 1st ]. A reaction is stopped and it stirs for at least 48 hours. If a start raw material converts into an aminoglycoside product completely, evaporation removal of the solvent is carried out, and a rough solid-state will be processed with toluene several times, and will carry out evaporation to dryness. Subsequently, a solid-state is cooled in an ice bath and the solution which adds a pyridine and the solution of 40% acetic anhydride 60%, and contains an acetic anhydride with 500 superfluous mole percents is obtained. A reaction is protected from moisture, and is stirred and it warms to ambient temperature overnight. Evaporation removal of the solvent is carried out, it dissolves in toluene several times and evaporation to dryness of the residue is carried out. By refining rough applying it to flash chromatography, the fault acetylation NAc-allyl compound glycoside object of isolation sugar is acquired.

Subsequently, fault acetylation NAc-allyl compound glycoside is dissolved in an anhydrous methanol, and 0.1 - 0.01M solution is obtained. Several drops, in addition reaction mixture are stirred for the 1-N solution which melted NaOMe to MeOH with ambient temperature for 3 hours. Dowex 50 sufficient resin (H<sup>+</sup> object) to neutralize a base -- in addition, evaporation to dryness of the solution is filtered and carried out next (a request can perform purification by recrystallization). A product is N-allyl compound glycosyl amide (glycoslamide) object of a carbohydrate. Although it does not limit by these synthetic reactions, N-allyl compound glycosyl amide object of various carbohydrates, such as a glucose, a NAc-glucosamine, fucose, a lactose, tree NAc-chitotriose, a Sulfo Lewisx analog, and a Sialyl Lewisx analog, was acquired. Probably, this contractor recognizes that this approach is generally applicable in order to combine the carbohydrate of an extensive class with a diacetylene lipid.

III. ganglioside GM 1 Ganglioside GM 1 shows an example of incorporating ligand, without carrying out covalent bond to a self-assembly nature monomer. Ganglioside GM 1 was introduced into the biopolymer ingredient by mixing the chloroform which PDA was dissolved [ chloroform ] and dried the methanol solution which dissolved ganglioside GM 1. Ganglioside includes the hydrophobic field which promotes the nest to self-assembly nature surfactant structure. Therefore, when a desiccation solution was re-suspended in deionized water, the mixture of ganglioside and PDA was contained in the structure acquired. As indicated by the example 1, the form of liposome and others arose from re-suspension mixture. Although ganglioside did not contain a polymerization nature machine, embedding of the ganglioside was carried out to the polymerization matrix produced according to bridge formation of diacetylene. The same approach can be used for the nest of the ligand (for example, film penetration protein and a lipoprotein) of others including a hydrophobic field.

IV. protein The approach of others well-known at NHS-PDA, the thiol connection PDA, and this technical field which were manufactured above offers the functional group for association of protein and an antibody. The polymerization of NHS or the thiol connection monomer is incorporated and carried out to desired floc. Subsequently, NHS or a thiol functional group offers the surface reaction part for carrying out covalent bond to protein and an antibody using a standard chemosynthesis reaction in this technical field. In another embodiment, a hydrazide functional group can be arranged on PDA and, thereby, connection to the aldehyde and ketone group of protein and an antibody is attained. These embodiments offer the means for incorporating the quite extensive array of protein and an antibody on a biopolymer ingredient. An example is shown below. These examples are for only explaining the extensive applicability of this invention, and do not limit this invention to these specific embodiments.

A. Hexokinase The NHS-PDA lipid was compounded as mentioned above. When stated briefly, 1.00g 10 and 12-pen TAKOSA gene acid (pentacosadiynoic acid) (Farchan, gay NESUBIRU (Gainesville), floor line) were dissolved in CHCl<sub>3</sub> (what added 0.345g N-hydroxysuccinimide (NHS) and a 0.596g 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride). The solution was stirred at the room temperature for 2 hours, and CHCl<sub>3</sub> was removed using the Rota bop (rotavap) after that. Residue was extracted using EtOAc and water.

After separation, the organic layer was dried by MgSO<sub>4</sub>, and solvent removal was filtered and carried out. Subsequently, the non-refined product was recrystallized twice using CHCl<sub>3</sub>, and it checked by FT-IR. The 1:1 (mole ratio) PDA/NHS-PDA chloroform solution was used at the aquosity low order phase on the Langmuir-BUROIETTO trough (a KSV mini trough, KSV Instruments, Finland), and the micro syringe was extended (low order phase temperature was maintained at 5 degrees C).

The organic solvent was evaporated by leaving a solution for 20 minutes. The film was compressed to compact monomolecular-layer level, and it shifted to the glass slide subsequently covered with OKUDA decyltrichlorosilane (OTS) by perpendicular adhesion. Compression and an immersion rate were maintained to a part for 5mm/. Sufficient colorimetry signal to make three layers adhere on a glass slide, and detect after a polymerization was acquired, and in order to make it a hydrophilic front face certainly, it put to the solution.

It is important to prepare a stable PDA monomolecular-layer film before enzyme immobilization in order to make the background low and to raise the repeatability of a sensor. The Langmuir monomolecular-layer trough offers the approach for measuring the stability of a film by evaluation of surface \*\*\*\*\* (surface collapse pressure) of a monomolecular layer. The mixed film (namely, film which has PDA and NHS-PDA) is quite more stable than the monomolecular layer which consists of one constituent, and it turned out that it is therefore suitable with enzyme immobilization. For example, \*\*\*\*\* in 5 degrees C about a 1:1 NHS-PDA/PDA monomolecular layer is 57 mN/m, and, on the other hand, the NHS-PDA monomolecular layer and the PDA monomolecular layer were crushed by 34 and 28 mN/m, respectively. Although he does not need to understand the device although this invention is used, and he does not plan to limit this invention such, an interaction is considered to be more desirable in these mixed monomolecular layers by the optimal spatial arrangement which makes it possible to be densely filled up with the head radical of various magnitude probably.

The monomolecular layer other than mechanical stability should have the desirable optical property (namely, high color reinforcement) suitable for a sensor. Film quality and in this specification, color reinforcement was studied in various \*\*\*\*\*. It turned out that a best movement ratio and color reinforcement are obtained with the film manufactured by 40 mN/m. Therefore, the 1:1 NHS-PDA/PDA film obtained by this \*\*\*\*\* was chosen for qualification by hexokinase.

Yeast hexokinase suspension (E. C.2.7.1.1, the product made from Boehringer Mannheim GmbH, Germany) was rotated with the micro centrifuge, and the saturation ammonium sulfate was removed. Protein was remelted to the phosphate buffer solution (pH8.0) of 0.1M, was made into about 1mg [ /ml ] concentration, and was dialyzed for 3 hours using the Slide-A-Lyzer dialysis cassette (Pierce) to the same buffer solution. The PDA monomolecular-layer slide was cut to the 0.7cmx2.5cm piece of a rectangle, and it incubated at 4 degrees C in the hexokinase solution for 1 hour. When long duration incubation was carried out, probably omission of LB monomolecular layer under chemistry crosslinking reaction showed that color reinforcement fell. Subsequently, it is deionized water, the monomolecular-layer chip was rinsed, it was immersed in 0.1M ethanolamine for 10 minutes, and the reaction was made to end. It is deionized water again, and the chip was rinsed, and was air-dried. The polymerization was performed by irradiating a film with UV lamp supported by hand.

Irradiation time was each \*\* 6 minutes. An irreversible color change in red arises by long duration exposure. B. Antibody First, commercial diacetylene was filtered, the insoluble impurity (for example, polymer) was removed, and it was made to convert into NHS-PDA chemically as mentioned above. NHS-PDA of a suitable amount and the PDA derivative (for example, a dopant or ligand) of other forms were mixed, and the desired mole ratio was obtained. The solution was dried using N<sub>2</sub> gas and the thin layer of the white matter was made to adhere to the pars basilaris ossis occipitalis of a vial. Deionized water was added and sum density of a lipid was set to about 1 mM. By using a bath sonication machine for about 20 minutes for 2 hours or more, using a probe sonication machine, sonication of the solution was carried out until the transparent solution was obtained. It filtered with 5-micrometer filter, heating a solution, and, subsequently was kept at 4 degrees C overnight.

Before bridge formation, the phosphate buffer solution (pH8.5) of 0.1M was added to the liposome solution. Subsequently, the antibody which dissolved in the same buffer solution was added, and the solution was kept at 4 degrees C overnight. Centrifugal separation or dialysis removed the superfluous antibody. When centrifugal separation was used, re-sonication of the pellet was quietly carried out using the ice bath. After the meeting of the antibody to the ingredient which carried out sonication, as the polymerization was indicated about the liposome of an example 1, it was performed.

Moreover, an antibody can also be combined with a biopolymer ingredient by hydrazide. In some embodiments, there may be this preferably to NHS-coupling. It is because NHS can react in the Fab' field of an antibody and association to ANARAITO is blocked. The hydrazide method produces association to the biopolymer ingredient of Fc field of an antibody, and maintains a joint field at an available condition. In the

hydrazide method, a hydrazide-PDA lipid is manufactured and non-polymerization liposome arises (for example, 20% hydrazide PDA / 80%TRCDA). Using Centricon50 filter, the preservation antibody solution of 500microl was washed by adding the 123mM sodium citrate (pH5.5) of the amount of isochore, and was rotated for 9 minutes by 4000rpm. The filtration process was repeated twice or more. Next, citrate-buffer-solution 400 microliter which added the antibody was oxidized by incubating at 22 degrees C with the sodium periodate of 25microl for 2 hours. The reaction was stopped by adding N-acetyl methionine of 50microl 2 hours after. Next, the liposome of 300microl, the citrate buffer solution of 150microl, the water of 400microl, and the oxidization antibody of 200microl were incubated at 22 degrees C overnight. Centricon 500 filter is used, the tris buffers (pH9.0) of 900microl wash, and an uncombined antibody is removed from liposome by carrying out at-long-intervals alignment separation by 4000rpm for 2 minutes. After washing many times, a sample is diluted with tris buffers (accepting the need), and the liposome solution of 0.2mM (following) is manufactured.

V. In addition to this (amino acid, nucleotide, etc.)

As shown in the above and drawing 9, association to the diacetylene of amino acid was obtained by amine connection. The means of various others about association to the lipid of amino acid is also well-known at this technical field.

Production of PDA-connection ligand including the chemistry head machine kind with which versatility differs is indicated by the example 7 to VOC detection. These examples show induction of PDA by hydroxyl without the charge of a hydrophilic property, the primary amine functional group, the amino acid derivative, and the chemistry head radical of an extensive class like a hydrophobic radical. Such qualification and other qualification are performed by the well-known synthesis method by this technical field.

In other embodiments, the surface-active-agent connection ligand of various others may be prepared using the condensation reaction in which an activation carboxylic-acid radical and nucleophilicity amino, or HIDOROKISHI participates. An activity asymmetry anhydride can be made to form by activating PDA using trimethyl acetyl chloride under anhydrous conditions. Ethylene diamino-PDA (EDA-PDA) or ethanolamine-PDA (EA-PDA) can be made to form by processing this anhydride by superfluous ethylenediamine or ethanolamine, respectively. A reaction is continued for the triethylamine of one mol or the half-mol equivalent at a room temperature as a catalyst base for 3 hours. The chromatography using a silica gel column and chloroform / methanol inclination refines EDA-PDA and EA-PDA. Subsequently, EDA-PDA or EA-PDA is condensed with the isolation carboxylic acid containing ligand (what was activated chemically as mentioned above), and a ligand connection polymerization nature surfactant is made to form. As an example of representation of the ligand which may be prepared by this approach, although it does not limit, a carbohydrate, a nucleotide, and a biotin are mentioned.

The example of others of a large number about what is made for a molecule to connect or meet well on a lipid and the film is included in this technique. Chain length may be improved and ligand and the self-assembly nature monomer which met can consist of a duplex or a multiplex chain. The quite extensive array of the biopolymer ingredient which fitted the interaction with ANARAITO of an extensive class which has a desired colorimetry response, selectivity, and sensibility with such various combination of ligand and a monomer is obtained.

Example 6 Colorimetric-analysis I. vision detection In a desirable embodiment, colorimetry change of the biopolymer ingredient of this invention is detected by the simple observation by human eyes. Since observation is simple, this purpose may be attained by observer like the user in a home who is not trained.

II. visible analytical-absorption-spectroscopy method OK, in some embodiments, there may be recording an undetectable delicate change or a faint signal by human eyes preferably about the exact quantitative data of a colorimetry response. A spectral-analysis method may be applied in order to obtain such data.

Visible absorption research was done using the Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer. To the PDA ingredient (namely, a film and liposome), the quantum of the colorimetry response (CR) was carried out by measuring the rate of change of the absorption in 626nm (that is, blue is given to an ingredient) to the general absorption maximum.

Visible absorption spectrum of the biopolymer ingredient which does not contain ANARAITO in order to carry out the quantum of the response of the biopolymer ingredient to ANARAITO of a given amount  $B0 = I_{626} / (I_{536} + I_{626})$

(B0 is defined among a formula as what broke the reinforcement of the absorption in 626nm by the sum total of the absorption intensity in 536 and 626nm.)

It analyzed by carrying out. About the biopolymer ingredient put to ANARAITO, it is the same format.  
 $Ba = I626 / (I536 + I626)$

(Ba shows the rate of the reinforcement of new absorption of ANARAITO and Ushiro who incubated among a formula.)

It analyzed by carrying out. Change of B at the time of being exposed to ANARAITO carries out the colorimetry response (CR) of a liposome solution comparatively, and it is defined.

$CR = [(B0 - Ba) / B0] \times 100\%$  Example 7 Detection of ANARAITO Detection of much ANARAITO is attained with the extensive biopolymer ingredient of a class taught by this invention. Such ANARAITO attains to a simple small organic molecule (for example, alcohol and sugar) from a complicated biological organism (example \*\*, a virus, bacteria, and parasite). In order to explain the extensive applicability of this invention [ as opposed to the range of an ANARAITO detection system for the concrete application of this invention ], and in order to show the singularity and the ease of use, it is shown below. These examples are for only explaining the extensive applicability of this invention. This invention is not limited to these specific embodiments.

I. Detection of an influenza virus This invention offers the detection means which was excellent in influenza compared with a technique available now. Immunological assay is restricted for the antigenic shift and drift which a virus shows. The influenza of all classes is detected, therefore decision of exposure of the patient to influenza will become decisive, and this invention will not be limited to a specific stock. The influenza stock which actually evolved newly and which is not characterized is detectable.

As the sialic-acid connection biopolymer ingredient was indicated in the example 1 and the example 5, it was produced in them. This ingredient is put to an influenza virus, as colorimetry information was observed in \*\*\*\* or it was indicated by the example 6, it observes by the spectral-analysis method, and it is blue (continuous line).

And the red phase (dotted line) ingredient was shown in drawing 27, respectively. Since producing the optimal virus association by former research to liposome to the object mixed 1 to 10% to liposome was shown (Spevak et al., J.Am.Chem.Soc.161:1146[1993]), 1 - 10% mixture of the sialic-acid connection PCA was incorporated.

About the liposome (namely, liposome prepared with the sol-gel method) confined in silicate glass, it turned out that 5 and 7-DCDA brings about a colorimetry response clearer than 10 and 12-PCA. The improvement in the response by 5 and 7-DCDA is considered to be a thing related to the topochemical-property about change of the conformation which can answer a size limit and colorimetry transition of a sol-gel method although an understanding of the device is unnecessary to operation of this invention.

one operative condition -- the exposure for [ of the sialic-acid connection PCA which sets like and contains a liposome solution ] 5 - 10 minutes -- \*\* -- blue liposome generates and, on the other hand, purple arises by the polymerization for 10 - 30 minutes. When an influenza virus is added to liposome, an ingredient changes to pink or orange and it is dependent on whether as for this, the early preparation object was blue respectively, or to have been purple. Such color change was able to be easily seen by the naked eye.

It went the competitive inhibition experiment in order to show the singularity of a ligand-ANARAITO interaction. It experimented as mentioned above except having used the superfluous a-O-methyl-*noy* RAMACHIN acid (neuramatic acid) (well-known inhibitor to influenza virus agglutination of blood) slightly. Color change which can detect a biopolymer ingredient was not produced by existence of an inhibitor.

An influenza virus detection system can consider that the ligand of the addition which recognizes and distinguishes an influenza stock or a human serum protein type from other pathogens from each other is included.

The sialic acid containing the biopolymer ingredient of this invention offers the detection means of the pathogen of many others. In addition to an influenza virus, others a sialic acid, and although it does not limit, it has detectivity, such as HIV, chlamydia, reovirus, SUTOREPUTOKOYUKASU Switzerland (Streptococcus suis), Salmonella (Salmonella), Sendai Virus, mumps, New Castle, myxovirus, and Neisseria MENINJITIDISU (Neisseria meningitidis).

Detection of II. cholera toxin A cholera toxin is the endotoxin of gram negative *Vibrio cholerae* which causes *Homo sapiens* a lethal diarrhea disease potentially. A cholera toxin is constituted from two subunits A (27kDa) and B (11.6kDa) by Stoichiometry AB. B component is specifically combined with the GM-1 ganglioside on cell surface, and the translocation which finally passes the film of A1 fragment is produced.



A cholera toxin may be recognized with the polymerization Langmuir-BUROIETTO film containing a GM1-content support lipid membrane, GM1, and a carbohydrate "promotor" lipid, as shown by Pan and Charych (Langmuir 13:1365 [1997]).

Ganglioside GM 1, the cholera toxin of the *Vibrio Cholerae* origin, a human serum albumin, and wheat germ agglutinin were purchased from Sigma. 5 and 7-docosa gene acid was compounded.

deionized water -- distilled water -- Miliporemicro F -- it was obtained by letting it pass to the super-purification train. The used solvent was reagent grade. Ganglioside GM 1 was mixed at a diacetylene "matrix lipid" monomer and five-mol%. Liposome was prepared using the probe sonication method and carried out the polymerization by UV irradiation (254nm). the joint en-Inn principal chain of poly diacetylene liposome -- \*\*\*\*\* -- the blue/purple solution arose.

The newly prepared visible absorption spectrum of purple liposome is shown in drawing 25 .

For colorimetry assay, the cholera toxin was diluted [ ml ] with 50mM tris buffers and pH7.0 in 1mg /. The blue phase liposome manufactured as mentioned above within the glass cuvette of 500microl was diluted with 50mM tris buffers and pH7.0 to 1:5. Preliminary incubation of the liposome was carried out for 15 - 30 minutes in the buffer solution, and the stability of a blue phase was secured before addition of a cholera toxin. In the meantime, change of a color was not observed.

The cholera toxin was added to the cuvette with the continuation addition method. Contents were mixed after each addition and the visible absorption spectrum was recorded as a function of time amount. Typically, as shown in drawing 26 , it was observed that 95% of absorption change arises within 2 minutes of the beginning after toxin addition. The contents of a cuvette were moved to one well of a white microtiter plate after each experiment. The pink-orange of cholera processing liposome was visually confirmed using the blue negative control.

The electronegative response was observed when ganglioside GM1 ligand was removed from liposome. Similarly, the electronegative response was obtained when the protein of others other than a cholera toxin was added to equivalent amount GM1-content liposome. A human serum albumin, avidin, and wheat germ agglutinin are contained in this.

A kinetics-experiment shows being generated within the first 2 minutes of the toxin addition of 95% or more to color change. As shown in drawing 28 , color transition is dependent on the amount of the toxin added to the solution instead of an operation of \*\* or nothing. S character-like behavior suggests the cooperativity of colorimetry transition. Although he does not need to understand the device and does not plan to limit this invention such in order to use this invention, this is considered to be what can show \*\* that the association itself is collaboration-like for the purpose of combining the toxin to which association of the toxin to GM1 ligand follows it conveniently. On the other hand, it is more appropriate for this result to be understood from the point of that result in the effective bond length of lipid-polymer side-chain conformation and the poly diacetylene principal chain, and it obtains it. If it decreases as a result of toxin association of effective bond length, the perturbation of the remaining after that of a lipid-polymer principal chain can become more convenient.

Detection of an III.E.coli toxin Liposome was prepared using five-mol% of GM1 and, and 95% of 5 and 7-DCDA. For colorimetry assay, the E.coll toxin (Sigma) was rotated at 15 degrees C by 2000xg through 30K molecular weight cut-off filter, and the salt was removed. Protein was re-diluted with the tris buffers of 50mM(s), and pH7.0, and it was made the 1mg [ /ml ] last concentration.

The visible absorption spectrum of 5%GM1 of Saki who puts to an E.coli toxin ligand, and the polymer nature liposome which contains 5 and 7-DCDA 95% is shown in drawing 29 . Liposome was diluted with the tris buffers of 50mM(s), and pH8.0 within the disposable cuvette made from plastics, and it was made last concentration 0.2mM. The solution in a cuvette was purple when it saw by the naked eye.

The above-mentioned E.coli of 40microl was added to the liposome solution in a cuvette, and the sample was incubated for 10 minutes. As shown in drawing 30 , the visible absorption spectrum was recorded again. When the solution in a cuvette was seen by the naked eye after it added the toxin, it was pink to the purple before addition. Drawing 29 and the absorption spectrum of 30 check observed color change.

Detection of the pathogen of IV. and others This invention may be used also for detection of the pathogen of various others again. ligand (for example, a carbohydrate, protein, and an antibody) specific for many pathogens -- the above -- and it is incorporable into a biopolymer ingredient using a well-known predetermined chemosynthesis method by this technical field. In order that some of examples of a pathogen detection system may explain the various approaches which may be applied using this invention and they

may explain the extensive ability to detect of an independent ligand kind (for example, sialic acid), it is shown below.

In order that existence of parasites, such as Plasmodium (pathogen which causes malaria), might detect, the sialic-acid induction-ized ingredient of this invention was used. The host binding site saved hereditarily was used in these embodiments. The PDA film containing the above sialic acids was put to the solution containing a malaria parasite and an erythrocyte. The film became pink after putting to a parasite overnight. The color response (CR) of each \*\*\*\* was about 100%. using this system with other trial ingredients (for example, array of a biopolymer ingredient which has various ligands) -- especially, existence of the toxic kind of Plasmodium, a stock (for example, P.falciparum), or other pathogens is identified, and is considered to be distinguished.

In still more nearly another embodiment, existence of Neisseria GONOREE (Neisseria gonorrhoeae) and Vibrio vulnificus (Vibrio vulnificus) was well detected by using an antibody as ligand. The nest of the antibody to a biopolymer ingredient is indicated by the example 5.

This invention offers the various means for detecting the pathogen of extensive classes, such as bacteria, a virus, and a parasite, so that clearly from these examples.

V. Detection of the volatile organic chemistry matter (VOC) The fixed embodiment of this invention offers the means for detecting an volatile organic compound (VOC) in colorimetric analysis. Most current VOC detection approaches need to take in a sample to the laboratory facility analyzed with a gas chromatography/mass spectrum. Although some of methodology in a site is used by spectroscopy-analysis, they need the bulky big components of a device [ like ]. Although these approaches are excellent in a quantum and identifying in the contaminant, they cannot secure each operator's insurance.

In one embodiment, this invention shows a harmful existence of VOC and offers the BADGE containing the fixed living body polymeric materials which offer the safety of the maximum workplace in the field containing VOC. As for this BADGE, reading is easy and simple, and the expertise for analyzing to a wearer's way is unnecessary. It is signaled that color change of the BADGE takes the suitable action for an individual. The BADGE reduces costs, and raises the effectiveness of environment management and restoration, and the downtime by an operator's illness is intentionally reduced by preventing too much exposure to the harmful matter potentially.

The two main approaches against VOC detection were adopted by various groups. Traditional analytical skill like GC/MS with which the 1st was improved for VOC detection is related (Karpe et al. (namely, approach based on an instrument), and J.Chromatography A 708:105 [1995]). However, these approaches are expensive, complicated and are not suitable for use at a site or a home. As for the 2nd, coupling of the lipid membrane on the front face of a detector is related (namely, organic-equipment approach). Some sensor equipments with which coating of the piezo-electric mass balance by the organic film involves were studied for the past ten years. These were studied in the array for the un-alternative property of coating. Please refer to these sensors (for example, Rose-Pehrsson et al., Anal.Chem.60:2801[1988]) like a quartz crystal microbalance (QCM) and surface acoustic wave (SAW) equipment. It has the number change of linear vibration with the applied mass. By applying coating of a polymer or others to a crystal, the sensor based on QCM or SAW is built. Complicated electronics is participating in use of SAWQCM and an electrode radical system reduces the applicability for using these approaches as an individual safety device. This invention is the indispensable part of organic layer structure instead of signal transduction being the signal transduction to electronic formula equipment, and differs from these approaches. Furthermore, the embodiment of this invention promotes optical detection of a signal instead of electronic detection.

Furthermore, this invention can offer the flexibility in a materials design, and can fix it to a cartridge (for example, BADGE) small to instead of [ which needs electronic equipment ] easily.

It was observed during development of this invention that the transition to red from strong blue arises by the interaction of an volatile organic solvent and the fixed lipid-polymer film. The curve of drawing 31 shows the absorption spectrum of the PCA film in a blue phase. A film shifts to the red phase PCA by being exposed to about 500 ppm 1-octanol which dissolved in water. Generally extent of color change increases with extent of halogenation and aromaticity to the various solvents analyzed depending on the concentration of a solvent. In this research, the single component thin film film of PCA was prepared, and the polymerization was changed into the blue condition by UV exposure (254nm). These ingredients have sensibility higher than a water miscibility solvent to water-immiscible solvent. About miscibility alcohol, it turned out that a response increases [ isopropanol ] dramatically compared with ethanol. This is because

extent of the solvent interaction to the film is probably larger. About the water immiscible solvent, a measurable color change was obtained at 0.05 % of the weight (500 ppm). Within this group, the same inclination was observed with increase of the chain length of alcohol, and increase of extent of chlorination. As shown in drawing 32 A and B, the water immiscible solvent of an extensive class was investigated by the water saturation concentration. As shown in B term, each concentration differs. In drawing 32 A, the y-axis shows extent of a colorimetry response or blue-red inversion. The upper figure of a bar shows the upper limit (ppm) of detection. It is clear that solvent concentration quite lower than 500 ppm is detectable about many of these solvents.

About the immiscible solvent which has comparatively high solubility to water, the effectiveness of the solvent concentration in a colorimetry response was able to be investigated. As 1-butanol was shown in drawing 33, it turned out that linear relation exists between the underwater solvent concentration of a colorimetry response and 0.05 - 8% of the weight of the range.

In pharmaceutical chemistry industry, since a pharmaceutical-sciences compound is manufactured by the organic chemistry reaction typically produced under existence of a solvent, the solvent sensor is needed. Before carrying out packaging of the drugs for using it for the animal of Homo sapiens or others, a solvent must be removed completely (Carcy and Kowalski, Anal.Chem.60:541[1988]). These detection approaches of VOC used now use the piezoelectric-crystal array for analyzing evaporation of the dryer of the powerful energy for spraying hot blast on drugs, and various solvents (Carey, Trends in Anal.Chem.13:210[1993]). This invention which carried out the patent claim on these specifications offers the approach based on the colorimetry which simplifies these measurement very much.

Furthermore, the interest in the analytic quantum approach of VOC in non-industry-indoor atmospheric environment is increasing dramatically in the past several years. This is because the consciousness over the sense of the emission from a common electrical home appliance or an office facility and a control building ventilator is mainly increasing. The firm which manufactures a home product is interested in responding to this need that increased by supplying the inside-of-a-house air monitor without the need of carrying out an air sampling and carrying out laboratory analysis after that which can guess the existence by dangerous in-situ of VOC. This invention which carried out the patent claim offers the embodiment for attaining such a means. The embodiment of this invention brings about increase of an air sampling, and a cartridge may actually be connected to an individual or a portable dc-battery actuation pump small [ for a general air sampling ].

Detection of the small organic molecule of VI. and others It is shown that the fixed clathrate compound or chelate like the compounds 1 and 2 of drawing 34 is an adsorbent alternative to the altitude to the steam of an organic solvent (Ehlen et al., Angew, Chem.Int.Ed.Engl.Vol.32, p.110 [1993]). For example, a compound 1 has high compatibility to dioxane, and has almost no compatibility to a butanol, an acetone, a methanol, 2-propanol, a cyclohexane, toluene, and water. On the other hand, a compound 2 shows compatibility higher than the same group's solvent to 1-butanol.

The purpose of this example is a thing to depend on colorimetry change which can show development of the new class of the high-performance material which carries out the trap of the small organic compound specifically, and can be detected visually and for which it confines (entrapment) and an event is reported. These ingredients act as sensor equipment based on the easy color which detects existence of a compound like the solvent in air or a stream or other toxic pollutants.

The 1st process includes composition of the lipid diacetylene analog of the compounds 1 and 2 as shown in drawing 34. In this drawing, the ester of PDA (pen TAKOSA gene acid)<sup>3</sup> pure in enantiomer is hydroxylated by oxidation of peroxidation molybdenum, and becomes alcohol 4. A diastereomer is separated, ester is hydrolyzed and it is made the chiral lactic-acid analogs 5 and 6. Ethyl ester is made to form and the desired chiral lipid analogs 7 and 8 are obtained by processing with a Grignard reagent. By changing R group, the new ingredient of an extensive class with which specific containment capacity is examined is obtained.

The monomer-lipid clathrate compound has aligned on a water front face using Langmuir-BUROIETTO film equipment, and is compressed. The above blue ingredients are obtained by the polymerization of the monomolecular layer by UV irradiation. A film is lifted on the hydrophobicity-ized microscope slide. A colorimetry response arises by exposing these ingredients to ANARAITO (for example, 1-butanol or dioxane).

Detection of the glucose by VII. hexokinase ligand About colorimetric measurement, in order to measure an

optical property, the above hexokinase qualification films were placed on the silanizing glass covering slide. The biosensor covering glass covering slide was put in in the glass cuvette, and UV-visible spectrum of a hexokinase qualification film was recorded in the 0.1M phosphate buffer solution (pH6.5). Measurement in this buffer solution was made into the background. A glucose or other sugar substitutes were directly added to the cuvette. what shows UV-visible spectrum of a hexokinase qualification PDA monomolecular layer when drawing 35 adds a glucose as a function of incubation time amount -- it is --  $t = 0.02$ -minute:  $t = 60$  minutes after  $t = 30$ -minute; and (D)10.0mM glucose addition are shown. [ after (A) background (0.1M phosphate buffer solution, pH6.5);(B)10.0mM glucose addition ] [ after (C)10.0mM glucose addition ] It is clear to cause a real time in which addition of a glucose is reflected by increase of the absorbance in 550nm. A response increases with time amount and reaches the peak after 60 minutes. Colorimetry responses (CR) were 5.2, 13.7, and 17.1% to  $t = 0.02, 30, \text{ and } 60$  minutes, respectively, as defined by the top. Color change was irreversible under these conditions.

The selectivity of a glucose sensor was investigated using the sugar compound similar to a glucose as shown in drawing 36 , and a structure target. All trials were performed in the 0.1M phosphate buffer solution (pH6.5). The right-hand side column of the 2nd last - shows glucose stirring in a PDA monomolecular layer without fixed hexokinase. The number of samplings about a glucose (n) is  $n = 6$ , and the remainder is  $n = 3$ . Addition of a 10.0mM sorbitol, a galactose, and a sucrose did not become the cause of a sensor. As for this, a sensor suggests \*\* of being quite specific, to a sugar glucose. In order to investigate the device of activation of a sensor further, the PDA monomolecular layer without fixed hexokinase was examined. Since CR [ / in  $t = 60$  minutes ] was equivalent to the background of a hexokinase joint PDA monomolecular layer, the significant response was not observed. By this result, it was shown that a glucose cannot guide color change of a PDA film independently. Existence of fixed hexokinase was required for making a sensor answer a glucose.

Example of VIII. and others The above-mentioned example shows ANARAITO of an extensive class detectable [ with this invention which attains to a simple small organic molecule (for example, alcohol) from a complicated biological organism (for example, a virus, bacteria, and a parasite) and which carried out the patent claim ]. Although ANARAITO of some others does not limit, it is well detected using the ligand connected with the biopolymer ingredient of \*\*, such as Clostridium botulinum neurotoxin detected using PDA incorporating ganglioside, (Pan and Charych, and Langmuir 13:1367 [1997]). In order to detect ANARAITO of an extensive class, it is thought that the ligand of many classes uses a well-known standard chemosynthesis technique by this technical field, and is connected with a self-assembly nature monomer. Furthermore, it can include in a biopolymer ingredient, without carrying out covalent bond of many of other kinds of ligands to a self-assembly nature monomer. These ingredients enable detection of a small molecule, a pathogen, bacteria, a film acceptor, a film fragment, an volatile organic compound, an enzyme, drugs, and many other related ingredients.

This invention which carried out the patent claim also finds out the use as a sensor in the application of various others. Color transition of a PDA ingredient is influenced by change of temperature and pH. Therefore, the approach and constituent of this invention which carried out the patent claim also find out the use as temperature and a pH detector.

Moreover, ligand can also be used in this invention, when they function as a contention binder to ANARAITO. For example, the amount of a natural acceptor and/or binding affinity can be measured by measuring the colorimetry response to ANARAITO under existence of the natural acceptor over ANARAITO. By using contention or an inhibition technique, very small compound which seldom reacts and matter which exists by low concentration very much, or a small number of univalent (single valiancy) matter can be examined. One application of this technique finds out the use as a means for development of drugs and amelioration by offering the screening assay for observing the competitive inhibition of a natural joint event. Since the constituent of this invention which carried out the patent claim is separable from other things by separating the related biopolymer ingredient which can observe association of a desired ingredient in colorimetric analysis, and has the related ligand further from specific polymer structure, the test method of the library of an ingredient is offered.

Example 8 Immobilization of the fixed I. silicon chip of living body polymeric materials, and gel Acid cleaning is carried out with 1:1 HCl / methanol, it is water, and silicon gel or a wafer is rinsed, and is put in into concentrated sulfuric acid. It is water thoroughly, and after rinsing, it silanizes under an inert atmosphere in 2% solution of 3-mercapto propyltrimethoxysilane which boiled a wafer chip or gel in the

deionized water distilled two steps, cooled, was dried and was prepared in desiccation toluene. Next, a chip or gel is put into 2mM solutions of GMBS (N-succinimidyl 4-maleimide butyrate) prepared in the 0.1M phosphate buffer solution (a cross linking agent is first dissolved into the dimethylformamide of the minimal dose), or EMCS (N-succinimidyl 6-maleimide KAPUROETO). It is a phosphate buffer solution, and after rinsing, a chip is put into 0.05mg [ /ml ] solution of liposome prepared in the phosphate buffer solution of pH8.0. Finally, after rinsing a chip or gel thoroughly with the buffer solution before use, it is kept in the buffer solution. In order to act, in order that liposome may construct a bridge with GMBS or EMCS - It should have two NH(s).

Sol-gel containment of II. living body polymeric materials The silica sol was prepared by carrying out sonication of 15.25g tetramethyl alt.silicate (TMOS), 3.35g water, and the 0.22ml 0.04-N hydrochloric-acid water solution until a solution becomes a plane 1 within a cooling bath (about 20 minutes). Subsequently, the cooling MOPS buffer solution (50%v/v)

It confirms that gelation was delayed by fully cooling a solution in an ice bath in addition to the acid sol. Although it does not limit, various ingredients, such as tetra-alkoxysilane of arbitration or a silane (for example, ORUMOSHIRU (ormosil)) embellished organically, fit manufacture of a silica sol. Furthermore, tetraethyl alt.silicate (TEOS), methyl triethoxysilane (MeTEOS), aryl silsesquioxane, and other metallic oxides are used in manufacture of sol-gel glass.

Subsequently, the polymerization nature ribosome solution (2.5ml) (what was manufactured in the example 1) was mixed to the buffer-ized sol (10ml), and the cuvette made from plastics was filled with mixture, and it applied as a film on the even front face, flowed into the desirable molding mold of others of arbitration, sealed by Parafilm, and was made to gel with ambient temperature for the containment of liposome.

Gelation of a sample arose within several minutes and, in the case of the gel formed by the cuvette, the monolithic solid-state (18mmx10mmx5mm) transparent as a purple monolith which has p-PDA liposome was obtained. Slight contraction of an aging monolith was observed by syneresis.

Containment of other biopolymer ingredient forms (namely, a film and the other nano structures) can be performed as mentioned above. When it is not small size, it is necessary to produce an ingredient in a small fragment, or to carve it, and to build it into the solution mixed with a buffer-ized sol.

example 9 Production of an array some operative conditions -- setting like, this invention includes manufacture of the big pallet of the polymerization nature lipid which has the chemical property of a head radical which is different in order to create an array. The lipid containing the head radical which has especially a carboxylic-acid radical (negative formal charge is given), the hydroxy group which has not carried out the electric charge of the hydrophilic property, a primary amine radical (forward formal charge can be given), an amino derivative (it has forward, negative, or a dipolar ion nature charge), and a hydrophobic radical may be manufactured. In some embodiments of this invention, coincidence detection of various ANARAITO or discernment of ANARAITO of the request from the interfering substance of the background becomes easy by combining these ingredients with one equipment. In some embodiments, the biopolymer ingredient containing various dopant ingredients is used in order to give a color pattern which is different into each part of an array.

For example, the big pallet of the polymerization nature lipid which has the chemical property of a different head radical can be manufactured, and an array can be created. For example, drawing 37 shows the lipid which has the chemical property of various head radicals. These may be classified into five groups based on the functionality of those head radicals. Compounds 2.4 and 2.5 give negative formal charge including a carboxylic-acid radical. Compounds 2.6 and 2.7 contain the hydroxy group which has not carried out the electric charge of the hydrophilic property. Compounds 2.8 and 2.9 have the primary amine radical which can give forward formal charge. The amino acid derivative 2.10 may have forward, negative, or a dipolar ion nature charge. Compounds 2.11-2.13 have a hydrophobic head radical.

Composition of these lipids leaves commercial PDA (2.4). All composition except 2.10, 2.12, and 2.13 may be performed by carrying out coupling of each head radical to PDA as mentioned above using the activation N-hydroxy succinimidyl ester of PDA (NHS-PDA). The amino acid lipid 2.10 may be prepared by drawing 38 from PDA in four steps using conversion to the bromide derivative with which lithium hydride aluminum and alcohol correspond, as shown. By making a bromide react with diethyl N-aceto imide malonate in the acetonitrile containing sodium hydride, it converts into protection-ized amino acid and deprotection is carried out after that. The fluorination lipids 2.12 and 2.13 may be prepared by making pentafluoro benzoyl chloride react with the amino lipids 2.8 and 2.9.

The ingredient prepared as mentioned above is placed into the chamber of equipment, or may be fixed to the specific part of equipment. By manufacturing the biopolymer ingredient which has the properties (for example, ANARAITO or reaction ability to detect, a color, ANARAITO compatibility) of various within one equipment, the array which has the capacity which identifies, identifies and carries out the quantum of the reaction and ANARAITO of an extensive class is manufactured.

Example 10 Detection I. phospholipase A2 of a film rearrangement It prepared by carrying out probe sonication of the mixture which added the polymerization nature matrix lipid 10, and 12-TORIKOSA gene acid and the various PLA2 base-material lipids (for example, DMPC) of a mol fraction (0 - 40%) for biopolymer liposome to water, and the polymerization was carried out by 1.6microJ/cm<sup>2</sup> UV irradiation (254nm) after that. Analysis by the transmission electron microscope showed that the diameter of an average vesicle was about 100nm.

those initial states -- setting -- a vesicle -- the naked eye -- \*\* -- it is blue and has the absorption maximum in about 620nm. The polymerization nature vesicle which consists of sum total lipids of PDA and 1mM 40%DMPC / 60% was diluted with 5mM tris buffers and pH7.0 to 1:10, and was made into the last capacity of 0.5ml within the standard cuvette, and the spectrum was recorded using Hewlett Packard spectrophotometer model 9153C. Bee toxin liquid phospholipase A2 (Sigma) was dissolved in the 10mM tris, 150mM NaCl, and 5mM CaCl<sub>2</sub> buffer solution and pH8.9, and PLA2 with a last concentration of 1.4mg [ /ml ] was obtained. This solution of 50microl was added to the cuvette, and the spectrum was recorded after 60 minutes. When PLA2 was added to the DMPC/PDA vesicle, suspension changed to red immediately (to namely, less than several minutes), and as it showed above-mentioned drawing 13 , it showed the maximum absorption by about 540nm.

The capacity to produce the colorimetry response was examined about the liposome containing mol%DMPC of a certain range. 1.4mg/ml PLA2 of five microliter was added to the DMPC/PDA vesicle of 50microl (the 0.1mM last sum total lipid concentration). The experiment was conducted on the standard 96 well plate using the Molecular Devices UV Max kinetic microplate reader. In the wavelength of 620nm, and 490nm, it acted as the monitor of the absorption of a vesicle solution as a function of time amount. Subsequently, the color response curve as plotted data by the colorimetry (response CR) opposite time amount and shown in above-mentioned drawing 17 was obtained.

In order to check that biocatalyst has arisen in the DMPC/PDA vesicle, PLA2 activity was separately measured using the indicator lipid analog included in the PDA matrix, and formation of a product and the colorimetry response of a vesicle were measured simultaneously. The used analog is thioester 1 and 2-screw. - (S-decanoyl) It was -1 and 2-dithio-sn-sn-glycero-3-phosphocholine (DTPC). 40%DTPC/PDA vesicle of five microliter was diluted with 6mM DTNB of 40mM tris pH 7.0 of 45microl, and 5microl, and it incubated with 1.4mg/ml PLA2 of 10microl. It acted as the monitor of the absorbance in 412nm over a certain period.

The NMR experiment was conducted, generating of the interface catalyst by PLA2 was checked further, and the information about the fate of an enzyme reaction product was acquired. The spectrum was recorded with the Bruker DMX500 NMR spectrometer in the 11.7-tesla magnetic field. The block collapse pulse array was used with the 2048 collection data point. In each experiment, 40000 free induction collapse was accumulated by recycle delay for 2 seconds. The 0.1M phosphoric acid was used as external reference. Drawing 16 shows <sup>31</sup>P NMR spectrum about the same vesicle suspension after addition of an A mixing DMPC/PDA vesicle and sum total lipid;BPLA2 (200ng) of 0.1mM.

II. phospholipase C and D Assay about phospholipase D and C was performed under the same conditions as phospholipase PLA2 assay. 40%DMPC/60%10 of all assay \*\*\*\*\* and 1mM(s) and 12-TORIKOSA gene acid (TRCDA) liposome were used. Phospholipase D and the preservation water solution of C were prepared by dissolving an enzyme in the 50mM tris, 150mM NaCl, and 5mM CaCl<sub>2</sub>pH8.9 buffer-solution and 20mM sodium-borate, 150mM NaCl, and 5mM CaCl<sub>2</sub>pH8.9 buffer solution by 1mg [ /ml ] concentration, respectively.

Subsequently, assay was performed by adding the enzyme of 50mM tris pH 7.0 (20 when [ Or ] examining PLC sodium-borate pH7.0 of mM(s)) of the liposome of 5microl, and 45microl, and 5microl. Assay acted as the monitor of for [ of the beginning ] 10 minutes by 620nm and 490nm every 2 minutes, and it acted as the monitor of for [ of the after that remainder ] 50 minutes every 10 minutes.

III. bungarotoxin Assay was performed under the same conditions as the above-mentioned experiment. BUTX (Molecular Probes B-3459) of 50mM tris pH 7.4 of 1mM40%DMPC / 60%TRCDA liposome of ten

microliter, and 35microl and 15microl was dissolved in 50mM tris, 150mM NaCl, and 5mM CaCl<sub>2</sub>pH7.4, and 2mg [ /ml ] solution was manufactured. It acted as the monitor of the spectrum every 2 minutes for [ of the beginning of an incubation ] 10 minutes, and acted as the monitor of for [ of the remainder ] 50 minutes every 10 minutes. It acted as the monitor of 490 and the absorbance in 620nm using the UV maximum micro pre auto reader.

Screening of IV. inhibitor Since the colorimetry event started by PLA2 was blocked, the inhibitor was used. The polymerization of the DMPC/PDA vesicle which contains MJ33 0.6% was carried out, and it incubated with 1.4mg/ml PLA2 of 5microl. The liposome to which the polymerization of the five microliter is not carried out was mixed with 50mM tris [ of 40microl ] pH 7.0, MJ [ of 5microl ] 33 (what was dissolved in water of 0.006M), 50mM tris [ of 5microl ], 150mM NaCl, and 5mM CaCl<sub>2</sub>pH8.9, and it incubated for 15 minutes. Subsequently, the polymerization of the liposome was carried out within 96 well plate, and the absorption spectrum was recorded in 490nm and 620nm. PLA2 of five microliter was added and it acted as the monitor of the spectrum with the specific time interval for 1 hour. For Zn<sup>2+</sup> inhibition, the enzyme was dissolved in 10mM tris, 150mM NaCl, and 0.1mM ZnCl<sub>2</sub>pH8.9.

All publications and patents that were mentioned above are included in this specification by reference. Probably, various amelioration and modification about the approach and system of this invention will be clear to this contractor, without deviating from the range and pneuma of this invention. Although this invention is indicated in relation to the specific desirable embodiment, it should be understood that it is not that by which this invention which carried out the patent claim is limited too much to such a specific embodiment. Various qualification clear to this contractor in the material science about the format as which it was actually indicated for carrying out this invention, chemistry and molecular biology, or a related field is included in the following claim.

---

[Translation done.]



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-515980

(P2002-515980A)

(43) 公表日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/544		G 0 1 N 33/544	A
G 0 1 J 3/46		G 0 1 J 3/46	Z
G 0 1 N 21/27		G 0 1 N 21/27	B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 138 頁)

(21) 出願番号 特願平10-538627  
(86) (22) 出願日 平成10年3月2日 (1998.3.2)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年9月3日 (1999.9.3)  
(86) 国際出願番号 PCT/US98/03963  
(87) 国際公開番号 WO98/39632  
(87) 国際公開日 平成10年9月11日 (1998.9.11)  
(31) 優先権主張番号 60/039,749  
(32) 優先日 平成9年3月3日 (1997.3.3)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
ティー オブ カリフォルニア  
アメリカ合衆国 94612-3550 カリフォ  
ルニア州, オークランド, レイクサイド  
ドライブ 300, 22エヌディー フロア  
(72) 発明者 チャリチ, デボラ  
アメリカ合衆国 94720 カリフォルニア  
州, アルバニー, テイラー ストリート  
909  
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 生体触媒の直接比色検出

(57) 【要約】

本発明は、生体高分子材料の色の変化を検出することにより膜のコンホメーション変化を直接検出するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、膜改変反応および前記改変反応に関与するアナライトの直接比色検出、並びに反応阻害剤のスクリーニングを可能にする。

## 【特許請求の範囲】

1. 反応を検出する方法であって、
  - a) i) 反応基質および多数の自己集合性モノマーを含む生体高分子材料、および
  - ii) 反応手段、を用意し、
  - b) 前記反応手段を前記生体高分子材料にさらし、そして
  - c) 前記反応の少なくとも部分的な発生を示す前記生体高分子材料の色の変化を検出する、ことを含んでなる方法。
2. 前記反応手段が脂質開裂手段を含む、請求項1に記載の方法。
3. 前記生体高分子材料の色の変化を定量するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。
4. 前記生体高分子材料がリポソーム、薄膜、細管、らせん状の集合体、繊維様の集合体、および溶媒和ポリマーよりなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
5. 前記自己集合性モノマーがジアセチレンモノマーを含む、請求項1に記載の方法。
6. 前記自己集合性モノマーが5,7-ドコサジイン酸、5,7-ペンタコサジイン酸、10,12-ペンタコサジイン酸、およびそれらの混合物よりなる群から選択されるジアセチレンモノマーを含む、請求項1に記載の方法。
7. 前記自己集合性モノマーがアセチレン類、アルケン類、チオフェン類、ポリチオフェン類、シロキサン類、ポリシラン類、アニリン類、ピロール類、ポリアセチレン類、ポリ(p-フィレンビニレン)、ポリ(p-フィレン)、ビニルピリジニウム、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
8. 前記生体高分子材料が1以上のリガンドをさらに含む、請求項1に記載の方法。
9. 前記1以上のリガンドがタンパク質、抗体、炭水化物、核酸、薬物、発色団

、抗原、キレート化合物、短鎖ペプチド、ペプスタチン、ディールス-アルダー試薬、分子認識複合体、イオン基、重合性の基、リンカー基、電子供与体、電子受容基、疎水基、親水基、受容体結合性基、三糖類、四糖類、ガングリオシド $G_{M1}$ 、ガングリオシド $G_{T1b}$ 、シアル酸、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

10. 前記1以上のリガンドが前記反応手段に対する親和性を有する、請求項8に記載の方法。

11. 前記生体高分子材料が1以上のドーパントをさらに含む、請求項1に記載の方法。

12. 前記1以上のドーパントが界面活性剤、ポリソルベート、オクトキシノール、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、両性イオン洗剤、デシルグルコシド、デオキシコール酸塩、ジアセチレン誘導体、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルメタノール、カルジオリピン、セラミド、コレステロール、ステロイド、セレブロシド、リゾホスファチジルコリン、D-エリスロシンゴシン、スフィンゴミエリン、ドデシルホスホコリン、N-ビオチニルホスファチジルエタノールアミン、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

13. 前記1以上のドーパントがシアル酸誘導体化ジアセチレン、ラクトース誘導体化ジアセチレン、アミノ酸誘導体化ジアセチレン、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

14. 前記生体高分子材料が支持体をさらに含み、前記生体高分子材料が前記支持体に固定されている、請求項1に記載の方法。

15. 前記支持体がポリスチレン、ポリエチレン、テフロン、雲母、セファデックス、セファロース、ポリアクリロニトリル、フィルター、ガラス、金、シリコンチップ、およびシリカよりなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

16. 前記開裂手段がリパーゼを含む、請求項2に記載の方法。

17. 前記リパーゼがホスホリパーゼ $A_2$ 、ホスホリパーゼC、およびホスホリパー

- ゼDよりなる群から選択される、請求項16に記載の方法。
18. アナライト基質および多数の自己集合性モノマーを含む生体高分子材料を用意し、前記アナライトを含むと予想されるサンプルを前記生体高分子材料にさらし、そして前記アナライトの存在を示す前記生体高分子材料の色の変化を検出する、ことを含んでなるアナライトの存在の検出方法。
19. 前記アナライトが脂質開裂手段を含む、請求項18に記載の方法。
20. 前記生体高分子材料がリポソーム、薄膜、細管、らせん状の集合体、繊維様の集合体、および溶媒和ポリマーよりなる群から選択される、請求項18に記載の方法。
21. 前記自己集合性モノマーがジアセチレンモノマーを含む、請求項18に記載の方法。
22. 前記自己集合性モノマーが5,7-ドコサジン酸、5,7-ペンタコサジン酸、10,12-ペンタコサジン酸、およびそれらの混合物よりなる群から選択されるジアセチレンモノマーを含む、請求項18に記載の方法。
23. 前記自己集合性モノマーがアセチレン類、アルケン類、チオフェン類、ポリチオフェン類、シロキサン類、ポリシラン類、アニリン類、ピロール類、ポリアセチレン類、ポリ(p-フィレンビニレン)、ポリ(p-フィレン)、ビニルピリジニウム、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項18に記載の方法。
24. 前記生体高分子材料が1以上のリガンドをさらに含む、請求項18に記載の方法。
25. 前記1以上のリガンドがタンパク質、抗体、炭水化物、核酸、薬物、発色団、抗原、キレート化合物、短鎖ペプチド、ペプスタチン、ディールス-アルダー試薬、分子認識複合体、イオン基、重合性の基、リンカー基、電子供与体、電子受容基、疎水基、親水基、受容体結合性基、三糖類、四糖類、ガングリオシド $G_{M1}$ 、ガングリオシド $G_{T1b}$ 、シアル酸、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項24に記載の方法。
26. 前記1以上のリガンドが前記アナライトに対する親和性を有する、請求項24に記載の方法。

27. 前記生体高分子材料が1以上のドーパントをさらに含む、請求項18に記載の方法。
28. 前記1以上のドーパントが界面活性剤、ポリソルベート、オクトキシノール、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、両性イオン洗剤、デシルグルコシド、デオキシコール酸塩、ジアセチレン誘導体、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルメタノール、カルジオリピン、セラミド、コレステロール、ステロイド、セレブロシド、リゾホスファチジルコリン、D-エリスロシンゴシン、スフィンゴミエリン、ドデシルホスホコリン、N-ビオチニルホスファチジルエタノールアミン、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項27に記載の方法。
29. 前記1以上のドーパントがシアル酸誘導体化ジアセチレン、ラクトース誘導体化ジアセチレン、アミノ酸誘導体化ジアセチレン、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項27に記載の方法。
30. 前記生体高分子材料が支持体をさらに含み、前記生体高分子材料が前記支持体に固定されている、請求項18に記載の方法。
31. 前記支持体がポリスチレン、ポリエチレン、テフロン、雲母、セファデックス、セファロース、ポリアクリロニトリル、フィルター、ガラス、金、シリコンチップ、およびシリカよりなる群から選択される、請求項30に記載の方法。
32. 前記開裂手段がリパーゼを含む、請求項19に記載の方法。
33. 前記リパーゼがホスホリパーゼA<sub>2</sub>、ホスホリパーゼC、およびホスホリパーゼDよりなる群から選択される、請求項32に記載の方法。
34. 阻害剤を検出する方法であって、
- a) i)反応基質および多数の自己集合性モノマーを含む生体高分子材料、  
ii)反応手段、および  
iii)阻害剤を含むと予想されるサンプル、
- を用意し、
- b)前記生体高分子材料および前記阻害剤を含むと予想されるサンプルを一

緒に合わせ、

c)前記生体高分子材料および前記阻害剤を含むと予想されるサンプルを前記反応手段にさらし、そして

d)前記生体高分子材料の色の変化の有無を検出し、それにより前記阻害剤の活性を検出する、

ことを含んでなる方法。

35. 前記生体高分子材料の色の変化を検出することが前記色の変化を1以上の対照サンプルに対比させることを含む、請求項34に記載の方法。
36. 前記生体高分子材料の色の変化を定量するステップをさらに含む、請求項34に記載の方法。
37. 前記反応手段が開裂手段を含む、請求項34に記載の方法。
38. 前記生体高分子材料がリポソーム、薄膜、細管、らせん状の集合体、繊維様の集合体、および溶媒和ポリマーよりなる群から選択される、請求項34に記載の方法。
39. 前記自己集合性モノマーがジアセチレンモノマーを含む、請求項34に記載の方法。
40. 前記自己集合性モノマーが5,7-ドコサジイン酸、5,7-ペンタコサジイン酸、10,12-ペンタコサジイン酸、およびそれらの混合物よりなる群から選択されるジアセチレンモノマーを含む、請求項34に記載の方法。
41. 前記自己集合性モノマーがアセチレン類、アルケン類、チオフェン類、ポリチオフェン類、シロキサン類、ポリシラン類、アニリン類、ピロール類、ポリアセチレン類、ポリ(p-フィレンビニレン)、ポリ(p-フィレン)、ビニルピリジニウム、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項34に記載の方法。
42. 前記生体高分子材料が1以上のリガンドをさらに含む、請求項34に記載の方法。
43. 前記1以上のリガンドがタンパク質、抗体、炭水化物、核酸、薬物、発色団、抗原、キレート化合物、短鎖ペプチド、ペプスタチン、ディールス-アルダー試薬、分子認識複合体、イオン基、重合性の基、リンカー基、電子供与体、

## 電

子受容基、疎水基、親水基、受容体結合性基、三糖類、四糖類、ガングリオシド $G_{M1}$ 、ガングリオシド $G_{T1b}$ 、シアル酸、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項42に記載の方法。

44. 前記1以上のリガンドが前記反応手段に対する親和性を有する、請求項42に記載の方法。

45. 前記生体高分子材料が1以上のドーパントをさらに含む、請求項34に記載の方法。

46. 前記1以上のドーパントが界面活性剤、ポリソルベート、オクトキシノール、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、両性イオン洗剤、デシルグルコシド、デオキシコール酸塩、ジアセチレン誘導体、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルメタノール、カルジオリピン、セラミド、コレステロール、ステロイド、セレブロシド、リゾホスファチジルコリン、D-エリスロシンゴシン、スフィンゴミエリン、ドデシルホスホコリン、N-ビオチニルホスファチジルエタノールアミン、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項45に記載の方法。

47. 前記1以上のドーパントがシアル酸誘導体化ジアセチレン、ラクトース誘導体化ジアセチレン、アミノ酸誘導体化ジアセチレン、およびそれらの混合物よりなる群から選択される、請求項45に記載の方法。

48. 前記生体高分子材料が支持体をさらに含み、前記生体高分子材料が前記支持体に固定されている、請求項34に記載の方法。

49. 前記支持体がポリスチレン、ポリエチレン、テフロン、雲母、セファデックス、セファロース、ポリアクリロニトリル、フィルター、ガラス、金、シリコンチップ、およびシリカよりなる群から選択される、請求項48に記載の方法。

50. 前記開裂手段がリパーゼを含む、請求項37に記載の方法。

51. 前記リパーゼがホスホリパーゼ $A_2$ 、ホスホリパーゼC、およびホスホリパー



ゼDよりなる群から選択される、請求項50に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 生体触媒の直接比色検出

本出願は、1997年3月3日に出願し、現在係属中の米国仮出願第60/039,749号の優先権を主張するものである。この仮出願の全内容は、引用により本明細書に含まれるものとする。

本発明は、DOE契約番号DE-AC03-76SF00098号で米国エネルギー省の支援を一部受けた研究の一部をなすものである。政府は、本発明に対してある一定の権利を有する。

## 発明の背景

本発明は、生体高分子材料の色の変化を検出することによって膜のコンホメーション変化を直接検出するための方法および組成物に関する。特に本発明は、膜改変反応(membrane modifying reaction)およびこのような改変の原因となるアナライトの直接比色検出、並びに反応阻害剤のスクリーニングを可能にするものである。

## 発明の背景

膜の再配列（例えば、特に、脂質開裂、重合、脂質フリッピング、膜貫通シグナル伝達、小胞形成、脂質化(lipidation)、糖鎖形成、イオンチャネリング、分子再配列、およびリン酸化）に関与する各種酵素や他の分子の活性の測定および同定は、膜の生物学および関連プロセス（例えば、シグナル伝達）を調節する方法および組成物の開発にとって重要である。このような方法および組成物は、数多くの症状（例えば、癌、糖尿病、ウイルス感染、および肥満などが挙げられる）並びに生理学的プロセス（例えば、記憶、老化、および代謝などが挙げられる）の調節および治療に用途を見出すことができる。

界面触媒作用は、このような膜再構成の1つの例であり、これらの膜再構成の特性付けと活用における現在の技術の利点と限界を例示するものである。生体膜

における界面触媒作用は、脂肪分解酵素、アシルトランスフェラーゼ、プロテインキナーゼ、およびグリコシダーゼ等のある範囲の酵素の種類を含み、細胞外および細胞内プロセスにおいて重要な役割を果たす。特に、脂肪分解酵素は、脂肪

消化とシグナル伝達を含む重要な生化学的プロセスに関与している。このような酵素の一つであるホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (例えば、Kini, *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes*, Wiley, Chichester [1997]; および Waite, *The Phospholipases*, Plenum Press, New York [1987] を参照) に対する最近の関心は、膜からのアラキドン酸およびリゾリン脂質の放出におけるその役割が契機になっている。これらの化合物は、エイコサノイド (例えば、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類、およびヒドロペルオキシ脂肪酸類) の生合成のための前駆体であり、このエイコサノイドは、喘息、虚血、およびリウマチ性関節炎等のある範囲の炎症性疾患に関与しており (例えば、Bomalaski および Clark, *Arthritis and Rheumatism* 36, 190 [1993]; Ramirez および Jain, *Proteins: Structure Function, and Genetics*, 9, 229 [1991]; 並びに Dennis および Wong, *Phospholipase A<sub>2</sub>: Role and Function in Inflammation*, Plenum, New York [1990] を参照)、かつ視覚 (例えば、Camras ら, *Ophthalmology* 103, 1916 [1996] を参照)、血小板凝集 (例えば、Wu, J. Formos, *Med. Assoc.* 95, 661 [1996] を参照)、脂肪細胞の分化 (例えば、Casimir ら, *Differentiation* 60, 203 [1996] を参照) および黄体分解 (例えば、Tsai および Wiltbank, *Biol. Reprod.* 57, 1016 [1997] を参照) 等の他の多くの生理学的プロセスに関与している可能性がある。従って、PLA<sub>2</sub> 阻害剤の同定は現在さかんに研究されている領域であり、新規な治療薬の開発と酵素活性のメカニズムへの新しい生化学的洞察をもたらす可能性がある (Dennis, 前掲; Gelb ら, *FASEB Journal* 8, 916 [1994]; 並びに Lin および Gelb, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 3932 [1993])。

PLA<sub>2</sub> は、グリセロリン脂質のもっぱら2-アシル位のアシルエステル結合の加水分解を触媒し、遊離の脂肪酸とリゾリン脂質を生成する。この活性を測定する典型的な方法としては、不連続放射化学技術 (Ehnholm および Kuusi, *Meth. Enzymol.* 129, 716 [1986])、蛍光技術 (Bayburt ら, *Analytical Biochemistry*, 232, 7 [1995])、および分光測光技術 (Reynold ら, *Analytical Biochemistry* 204, 190

[1992]) が挙げられる。これらの測定法では、標識アシルリン脂質を基質として使用し、酵素活性を放射能、蛍光、または開裂した脂肪酸の吸光度によって評価する。いくつかの手法、特に放射能標識法は、HPLC の薄層クロマトグラフィーに

よって開裂脂肪酸を未反応の基質から抽出および単離する必要がある場合がある。酵素活性の迅速な分析（例えば、可能性のある酵素阻害剤をスクリーニングするハイスループットアッセイ）を考えると、抽出工程と合成標識基質が必要なことは不利である。さらに、ホスホリパーゼの触媒作用はリン脂質基質の化学構造に影響されやすい(Graingerら, *Biochimica et Biophysica Acta* 1022,146[1990];並びにWuおよびCho, *Analytical Biochemistry* 221,152[1994])。従って、標識されていない天然に存在する基質を使用することが非常に望ましい。

この未標識の天然に存在する基質の必要性は、ホスホリパーゼ $A_2$ の特性決定に当てはまるだけでなく、他のホスホリパーゼ（例えば、ホスホリパーゼCおよびホスホリパーゼD）、一般的なりパーゼ（例えば、トリアシルグリセロールリパーゼ、リポタンパク質リパーゼ、および臍リパーゼ）、他の膜改変酵素（例えば、脂肪分解酵素、アシルトランスフェラーゼ、プロテインキナーゼ、およびグリコシダーゼ）、並びに任意の他の天然もしくは人工膜改変事象にも当てはまる。特に、改変事象の簡便な検出を提供し、かつ阻害剤のハイスループットスクリーニングを可能にする方法および組成物が望まれている。

#### 発明の概要

本発明は、生体高分子材料の色の変化を検出することによって膜のコンホメーション変化を直接検出するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、膜改変反応およびこのような改変の原因となるアナライトの直接比色検出、並びに反応阻害剤のスクリーニングを可能にするものである。

本発明は、反応を検出する方法を提供するものであり、反応基質と複数の自己集合性モノマーを含む生体高分子材料、および反応手段を用意し、生体高分子材料を反応手段に曝露し、反応が少なくとも部分的に起こったことを示す生体高分子材料の色の変化を検出することを含んでなる。ある実施形態では、この方法は、生体高分子材料の色の変化を定量する工程をさらに含む。

ある実施形態では、反応手段は脂質開裂手段を含む。特定の実施形態では、開裂手段はリパーゼを含む。具体的な実施形態では、リパーゼはホスホリパーゼ $A_2$ 、ホスホリパーゼCおよびホスホリパーゼDからなる群より選択される。

本発明は、生体高分子材料がリポソーム、薄膜、細管、らせん状集合体、繊維状集合体および溶媒和ポリマーからなる群より選択されるものである方法を提供する。ある実施形態では、生体高分子材料の自己集合性モノマーはジアセチレンモノマーを含む。ある実施形態では、自己集合性モノマーは、5,7-ドコサジイン酸(docosadiynoic acid)、5,7-ペンタコサジイン酸(pentacosadiynoic acid)、10,12-ペンタコサジイン酸、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるジアセチレンモノマーを含む。他の実施形態では、自己集合性モノマーは、アセチレン類、アルケン類、チオフェン類、ポリチオフェン類、シロキサン類、ポリシラン類、アニリン類、ピロール類、ポリアセチレン類、ポリ(p-フィレンビニレン(phenylenevinylene))、ポリ(p-フィレン(phenylene))、ビニルピリジニウム、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される。

本発明は、生体高分子材料が1種以上のリガンドをさらに含んでなる方法を提供するものである。ある実施形態では、リガンドは、タンパク質、抗体、炭水化物、核酸、薬剤、発色団、抗原、キレート化合物、短鎖ペプチド、ペプスタチン、ディールス-アルダー試薬、分子認識複合体、イオン基、重合性基、リンカー基、電子供与体、電子受容基、疎水基、親水基、受容体結合性基、三糖類、四糖類、ガングリオシド $G_{M1}$ 、ガングリオシド $G_{T1b}$ 、シアル酸、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される。ある実施形態では、リガンドは反応手段に対する親和性を有する。

本発明は、生体高分子材料が1種以上のドーパントをさらに含んでなる方法も提供する。ある実施形態では、ドーパントは、界面活性剤、ポリソルベート、オクトキシノール、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、両性イオン界面活性剤、デシルグルコシド(decylglucoside)、デオキシコール酸塩、ジアセチレン誘導体、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルメタノール、カルジオリピン、セラミド、コ

レステロール、ステロイド類、セレブロシド、リゾホスファチジルコリン、D-エ

リスロシノゴシン、スフィンゴミエリン、ドデシルホスホコリン、N-ビオチニルホスファチジルエタノールアミンおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される。具体的な実施形態では、ドーパントは、シアル酸誘導体化ジアセチレン、ラクトース誘導体化ジアセチレン、アミノ酸誘導体化ジアセチレン、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるジアセチレン誘導体を含む。

ある実施形態では、生体高分子材料は、生体高分子材料を固定化する支持体をさらに含む。特定の実施形態では、支持体は、ポリスチレン、ポリエチレン、テフロン、雲母、セファデックス、セファロース、ポリアクリロニトリル類(polyacrylonitriles)、フィルター、ガラス、金、シリコンチップ、およびシリカからなる群より選択される。

本発明は、アナライトの有無を検出する方法をさらに提供するものであり、アナライトに対する基質と複数の自己集合性モノマーを含む生体高分子材料を用意し、アナライトを含むと予想されるサンプルを生体高分子材料に曝露し、アナライトの存在を示す生体高分子材料の色の変化を検出することを含んでなる。ある実施形態では、アナライトは脂質開裂手段を含む。特定の実施形態では、開裂手段はリパーゼを含む。特定の実施形態では、リパーゼは、ホスホリパーゼ $A_2$ 、ホスホリパーゼ $C$ およびホスホリパーゼ $D$ からなる群より選択される。ある実施形態では、生体高分子材料は1種以上のリガンドをさらに含む。ある実施形態では、リガンドはアナライトに対する親和性を有する。

本発明は、阻害剤を検出するための方法をさらに提供するものであり、反応基質と複数の自己集合性モノマーを含む生体高分子材料、反応手段、並びに阻害剤を含むと予想されるサンプルを用意し、生体高分子材料と阻害剤を含むと予想されるサンプルとを合わせ、生体高分子材料と阻害剤を含むと予想されるサンプルを反応手段に曝露し、生体高分子材料の色の変化を検出して阻害剤の活性を検出することを含んでなる。ある実施形態では、生体高分子材料の色の変化の検出は、色の変化を1つ以上の対照サンプルと比較することを含む。ある実施形態では、該方法は、生体高分子材料の色の変化を定量する工程をさらに含む。

ある実施形態では、反応手段は脂質開裂手段を含む。特定の実施形態では、開

裂手段はリパーゼを含む。具体的な実施形態では、リパーゼは、ホスホリパーゼ $A_2$ 、ホスホリパーゼCおよびホスホリパーゼDからなる群より選択される。

#### 図面の説明

図1は、生体高分子薄膜の概略図を示す。Yは中心対称多分子層の薄膜であり、薄膜XおよびZは非中心対称多分子層である。

図2は、生体高分子リポソームの概略図を示す。Aは断面二次元図であり、Bは2等分したリポソームの三次元図である。

図3は、同一の生体高分子材料を含み、同一のアナライトに曝露した1)生体高分子リポソームと2)生体高分子薄膜を示す。

図4は、PDAモノマーから調製した未重合リポソームの大規模かつ主要な相転移を示す加熱曲線を示す。

図5は、圧縮薄膜を垂直板へ移しつつあるラングミュア-ブロッジェット装置の概略図を示す。

図6は、室温までしか冷却しなかった場合のリポソームの顕微鏡写真を示す。

図7は、4℃に冷却しながら調製したリポソームの顕微鏡写真を示す。

図8は、5,7-ペンタコサジイン酸の化学構造を示す。

図9は、脂質モノマーと結合させるために分子の遊離アミノ基を修飾する合成反応を示す。

図10は、アミノ酸誘導体化ジアセチレンモノマーからなる生体高分子材料の特性を示す。

図11は、シアル酸誘導体化10,12-ペンタコサジイン酸(化合物1)および10,12-ペンタコサジイン酸(化合物2)の化学構造を示す。

図12は、重合前(上段)および重合後(下段)のジアセチレン系脂質マトリックスにおける基質脂質(即ち、DMPC)を示す。

図13は、図12のリポソームをホスホリパーゼ $A_2$ へ曝露する前(実線)および曝露した後(破線)のリポソームの可視吸収スペクトルを示す。

図14は、ホスホリパーゼ $A_2$ 曝露に応答する様々な濃度のDMPCを含む図12のリポソームの比色応答における変化を示す。



図15は、各種時間にわたり  $\text{PLA}_2$  に曝露した後の1,2-ビス-(S-デカノイル)-1,2-ジチオ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DTPC) を含むリポソームの412nmにおける吸光度を示す。

図16は、 $\text{PLA}_2$  の添加前(A)および酵素反応後(B)のDMPC/PDA小胞の $^{31}\text{P}$  NMRスペクトルを示す。

図17は、 $\text{PLA}_2$  の存在下(●)および $\text{PLA}_2$  と阻害剤の存在下(■および◆)におけるDMPC含有リポソームの比色応答を示す。

図18は、ゾル-ゲルマトリックスにおけるポリジアセチレンリポソームの可視吸収スペクトルを示す。

図19は、リポソームを55℃へ加熱した後の図18の材料の可視吸収スペクトルを示す。

図20は、ジアセチレン薄膜の光学顕微鏡写真を示す。

図21は、シアル酸誘導体化PDAおよびガングリオシド $\text{G}_{M1}$ を含む場合と含まない場合のポリジアセチレン単分子層の特性を示す。

図22は、5%  $\text{G}_{M1}$  /5% SA-PDA/90% PDAの等温線を $\text{CdCl}_2$  のサブ相(subphase)濃度の関数として示す。

図23は、pH4.5、5.8および9.2における5%  $\text{G}_{M1}$  /5% SA-PDA/90% PDAの等温線を示す。

図24は、100% PDA、5% SA-PDA/95% PDA、および5%  $\text{G}_{M1}$  /5% SA-PDA/90% PDAの等温線に対する温度の効果を示す。

図25は、「青色相」5%  $\text{G}_{M1}$  および95% 5,7-ドコサジイン酸リポソームの可視吸収スペクトルを示す。

図26は、コレラ毒素に曝露した後の図25のリポソームの可視吸収スペクトルを示す。

図27は、インフルエンザウイルスに曝露する前(実線)および後(破線)のシアル酸含有薄膜の可視吸収スペクトルを示す。

図28は、コレラ毒素の濃度変化に応じたガングリオシド $\text{G}_{M1}$  含有リポソームの色の遷移を示す。

図29は、5%  $\text{G}_{M1}$  リガンドと95% 5,7-DCDAを含有する高分子リポソームの可

視吸収スペクトルを示す。

図30は、大腸菌毒素に曝露した後の図29の材料の可視吸収スペクトルを示す  
図31は、水に溶解した1-オクタノールに曝露する前(線a)および後(線b)のPCA薄膜の吸収スペクトルを示す。

図32は、各種VOCに対するPDA材料の比色応答を示す棒グラフ(A)と、VOCの濃度を示す表(B)を示す。

図33は、1-ブタノールの濃度に対する生体高分子材料の1-ブタノールへの比色応答を比較したグラフを示す。

図34は、低分子の有機化合物を検出するPDA誘導体を製造するための化合物と合成の概略を示す。

図35は、グルコースを添加した際のヘキソキナーゼ改変PDA単分子層のUV-Visスペクトルをインキュベーション時間の関数として示す。(A)バックグラウンド、(B)t=0.02分、(C)t=30分、(D)t=60分。

図36は、ヘキソキナーゼ含有生体高分子材料の各種糖に対する比色応答を示す。

図37は、検出アレイに用いるPDAの誘導体化を示す。

図38は、図37の化合物2.10の有機合成を示す。

## 定義

本発明の理解を容易にするため、いくつかの用語および表現を以下に定義する。

本明細書中、用語「反応」とは、物質(例えば、分子、膜、および分子集合体)を他の物質と結合させる、成分を他の物質と置き換える、分解する、再配列する、または化学的に改質する任意の変化または変換をいう。本明細書中、用語「反応手段」とは、反応を開始および/または触媒する任意の手段をいう。このような反応手段としては、限定するものではないが、酵素、温度変化、およびpH変化が挙げられる。表現「反応手段に対する親和性」とは、所定の反応手段と特異的に会合する(例えば、結合する)能力を有する化合物をいうが、反応手段のための基質に限られるものではない。例えば、PLA<sub>2</sub>抗体はPLA<sub>2</sub>に対する親和性を有するが、この抗体は該酵素の基質ではない。

本明細書中、用語「固定化」とは、材料の動きを制限するように、材料を別の物体（例えば、固相支持体）へ化学的にまたは他の方法で結合または拘束させることをいう。

本明細書中、用語「材料」とは、最も広い意味での、物質の任意の組成物である。

本明細書中、用語「生体高分子材料」とは、重合した生体分子（例えば、脂質、タンパク質、炭水化物、およびこれらの組み合わせ）で構成される材料をいう。このような材料としては、限定するものではないが、薄膜(film)、小胞、リポソーム、多分子層、凝集体、膜(membrane)、および溶媒和ポリマー（例えば、溶媒中における円柱状およびコイル状等のポリチオフェン凝集体）が挙げられる。生体高分子材料は、重合マトリックスを構成しない分子（即ち、重合しない分子）を含むことができる。

本明細書中、用語「タンパク質」は最も広い意味で用い、2個以上のアミノ酸を含有する全ての分子または分子集合体をいう。このような分子としては、限定するものではないが、タンパク質、ペプチド、酵素、抗体、受容体、リポタンパク質、および糖タンパク質が挙げられる。

本明細書中、用語「抗体」とは、免疫原（抗原）によって動物に誘発される糖タンパク質をいう。抗体は免疫原に対して特異性を示し、より具体的には、免疫原に含まれる1つ以上のエプトープに対して特異性を示す。天然の抗体は少なくとも2本の軽鎖ポリペプチドと少なくとも2本の重鎖ポリペプチドを含んでいる。重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、ポリペプチド鎖のアミノ末端部分に可変領域（即ち、それぞれVHおよびVL）を含み、この領域は抗原と相互作用する結合ドメインを含む。重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、ポリペプチド鎖の定常領域（通常はカルボキシ末端部分）も含んでおり、この領域は、免疫系の各種細胞、いくつかの食細胞および古典的な補体系の第1成分(C1q)に作用する宿主因子または組織への免疫グロブリンの結合を媒介する。軽鎖の定常領域は「CL領域」といい、重鎖の定常領域は「CH領域」という。重鎖の定常領域はCH1領域、CH2領域およびCH3領域を含む。重鎖のCH1領域とCH2領域の間の部分は、ヒンジ領域（即ち、「H領域」）という。細胞表面型抗体の重鎖の定常領域は、

スパーサー-膜貫通領域(M1)と膜カルボキシ末端の細胞質領域(M2)をさらに含んでいる。分泌型の抗体は、通常M1およびM2領域を欠いている。

本明細書中、用語「生体高分子薄膜」とは、薄切片状または層状で使用される重合有機薄膜をいう。このような薄膜としては、限定するものではないが、単分子層および2分子層を挙げることができる。生体高分子薄膜は、(例えば、タンパク質またはアナライト等の他の分子と相互作用する能力において)生体細胞膜を模倣することができる。

本明細書中、用語「ゾル-ゲル」とは、多孔性金属酸化物ガラス構造で構成される調製物をいう。このような構造は、多孔質構造内に捕捉された生体材料または他の材料を有することができる。表現「ゾル-ゲルマトリックス」とは、拘束された材料を含むかまたは含まない多孔性金属酸化物ガラスを含む構造をいう。用語「ゾル-ゲル材料」とは、ガラス材料自体およびガラスの多孔質構造内に拘束された任意の材料を含む、ゾル-ゲル処理によって調製された任意の材料をいう。本明細書中、用語「ゾル-ゲル法」とは、多孔性金属酸化物ガラスを製造する任意の方法をいう。ある実施形態では、「ゾル-ゲル法」は、穏やかな温度条件下で実施されるこのような方法をいう。用語「ゾル-ゲルガラス」および「金属酸化物ガラス」とは、ゾル-ゲル法で調製されたガラス材料をいい、無機材料または有機/無機混合材料を含む。ガラスの製造に使用される材料としては、限定するものではないが、アルミネート類、アルミノシリケート類、チタネート類、オルモシル類(ormosils; 有機的に修飾したシラン類)、および他の金属酸化物を挙げることができる。

本明細書中、用語「直接比色検出」とは、仲介処理工程(例えば、色の変化を翻訳装置で処理して電子シグナルへ変換する工程)を用いない色の変化の検出をいう。この用語は、目視観察(例えば、人間の目による観察)並びに単純な分光測定法による検出を含むことを意図する。

本明細書中、用語「アナライト」とは、分析すべき任意の材料をいう。このような材料としては、限定するものではないが、イオン、分子、抗原、細菌、化合物、ウイルス、細胞、抗体、および細胞の一部を挙げることができる。

本明細書中で用いられている「選択的結合」という用語は、一つの材料と別の

材料との結合が特定の分子構造(すなわち特異的結合)の存在に依存したやり方で行われていることを意味する。例えば、受容体はそのリガンド結合部位と相補的な化学構造を有するリガンドと選択的に結合する。このことは、相互作用が勝手に起こるものであって分子同士の構造的な適合性によるものではない「非選択的結合」とは対比的である。

本明細書中で用いられている「バイオセンサー」という用語は、部分的にまたは全体が生物学的分子からなるいかなるセンサー装置をも意味する。伝統的な意味においては、この用語は「生化学的シグナルを定量可能な電氣的シグナルに変換する適切な変換装置と密接につながっている固定化された生物学的材料(酵素、抗体、細胞全体、細胞小器官、あるいはそれらの組み合わせ)からなる分析用器具またはシステム」(Gronow, Trends Biochem. Sci. 9:336[1984])を意味する。

本明細書中で用いられている「変換装置」という用語は、非電氣的現象を電氣的な情報に変換し、その情報を電氣的信号に翻訳する装置に転送する装置を意味する。そのような装置としては、測光法、蛍光測定法、および化学ルミネセンスを用いる装置；光ファイバーおよび光直接センシング(例えば回折格子カップラー)；表面プラズモン共鳴；電位差測定および電流測定電極；電界効果トランジスタ；圧電センシング；および弾性表面波(SAW)などがあるがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「小型化」という用語は、有用性(例えば携帯性、取り扱いの容易性、および配列への取り込みの容易性など)を高めるために、例えばサンプルのサイズなどのサイズを減少させることを意味する。

本明細書中で用いられている「安定性」という用語は、ある材料が劣化や置換に対して抵抗し信頼性および確実性を提供する能力を意味する。

本明細書中で用いられている「コンホメーション変化」という用語は、ある物質の分子構造の変化を意味する。この用語が単一分子あるいは分子の凝集物の構造の変化(例えば、ポリジアセチレンがアナライトと相互作用したときに生ずる構造変化)をも包含することを意図している。

本明細書中で用いられている「小分子」という用語は、低分子量(すなわち、10,000原子質量単位未満、好ましくは5,000原子質量単位未満)であって、コン

ホメーション変化を生ずるようなやり方でリガンドと結合するか、リガンドと相互作用するか、あるいは生体高分子材料と相互作用するいかなる分子をも意味する。

本明細書中で用いられている「病原体」という用語は、疾病の原因となる生物、微生物、あるいは因子で、ウイルス、細菌、寄生虫(原生動物門、扁形動物、袋虫類、鉤頭虫動物、および節足動物に属する生物を含むがそれらに限定されない)、真菌、プリオンなどがあるがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「細菌」という用語は、原核生物界の中のすべての門に属するすべての原核生物を意味する。この用語はマイコプラズマ、クラミジア、アクチノマイセス、ストレプトマイセス、およびリケッチアを含む、細菌とみなされるすべての微生物をも包含することを意図している。球菌、桿菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、プロトプラストなどを含む全ての形の細菌はこの定義に含まれる。「グラム陰性」および「グラム陽性」という用語は、当業界で良く知られているグラム染色操作で得られる染色パターンを意味する(例えば Finegold and Martin, *Diagnostic Microbiology*, 6th Ed.(1982), CV Mosby St. Louis, pp 13-15を参照せよ)。

本明細書中で用いられている「膜」という用語は、そのもっとも広い意味において材料のシート又は層を意味する。この用語はすべての「生体膜」(すなわち原形質膜、核膜、小器官膜、および合成膜を含むがそれらに限定されないいかなる有機性の膜)をも包含することを意図している。典型的には、膜は脂質、タンパク質、糖脂質、ステロイド、ステロール、および/またはその他の成分からなる。本明細書中で用いられている「膜断片」という用語は、膜のいかなる部分または破片をも意味する。「重合膜」という用語は、部分的または完全に重合した膜を意味する。

本明細書中で用いられている「膜の再配列」および「膜のコンホメーション変化」という用語は、膜の構造のいかなる変化をも意味する。このような変化はとりわけ物理的な摂動、加熱、酵素的および化学的反応で引き起こされる。膜の再配列をもたらす反応としては脂質の開裂、重合、脂質フリッピング、膜貫通シグナル伝達、小胞形成、脂質化、グリコシル化、イオンチャンネル化、分子の再配

列、およびリン酸化などがあるがそれらに限定されない。膜の再配列をもたらす酵素的触媒作用は遊離の酵素と生体高分子材料との相互作用(例えば生体高分子材料中の酵素基質との反応)の結果もたらされうるもの、およびアナライト(例えば、とりわけウイルス、細菌、および毒素など)中に存在する酵素活性の結果もたらされうるものである。

本明細書中で用いられている「脂質開裂」という用語は、脂質または脂質からなる材料が2つまたはそれ以上に分かれることとなるいかなる反応をも意味する。「脂質開裂手段」とは脂質開裂を開始する、および/または触媒するいかなる手段をも意味する。このような脂質開裂手段としては酵素、フリーラジカル反応、および温度変化があるがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「重合」という用語は、小分子のモノマーが繰り返し単位からなる大分子に転換されるような、いかなる工程をも包含する。典型的には、重合はモノマーが互いに化学的架橋を形成することである。

本明細書中で用いられている「膜受容体」という用語は、膜の構成成分であって他の分子または材料と相互作用を起こすことの出来るものを意味する。そのような構成成分としては、タンパク質、脂質、炭水化物、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。

本明細書中で用いられている「揮発性有機化合物」または「VOC」という用語は、反応性を有し(すなわち急速に蒸発する、爆発性である、腐食性であるなど)、典型的にはある濃度以上ではヒトの健康または環境に対して有害であるような有機化合物を意味する。VOCの例としてはアルコール、ベンゼン、トルエン、クロロホルム、およびシクロヘキサンが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「酵素」という用語は、化学的および生物学的反応を触媒することにあずかる分子または分子の凝集物を意味する。そのような分子は典型的にはタンパク質であるが、短いペプチド、RNA、リボザイム、抗体、およびその他の分子からなるものであっても良い。

本明細書中で用いられている「基質」という用語は、ある意味においては、材料または物質であってそれに対して酵素またはその他の反応手段が働くものを意味する。また別の意味では、この用語は、その上でサンプルが増殖するかあるい

は付着する表面を意味する。「反応基質」という用語はある反応手段のための基質を意味する(例えば「脂質基質」は脂質開裂手段に反応する)。本明細書中で用いられている「アナライト基質」という用語は、アナライトが反応する材料または物質を意味する。例えば、アナライトが酵素で、アナライト基質が酵素基質である。また別の意味では、アナライトが病原体であれば、アナライト基質は病原体と関連した「反応手段」により改変される材料またはサンプルからなる。

本明細書中で用いられている「リパーゼ」という用語は、脂質中のエステル結合に働く加水分解酵素群のいかなるものをも意味する。そのようなりパーゼとしては、とりわけ、トリアシルグリセロールの加水分解を触媒する腭リパーゼ、トリアシルグリセロールを加水分解してグリセロールと遊離脂肪酸にすることを触媒するリポプロテインリパーゼ、およびホスホリパーゼがあるがそれらに限定されない。「ホスホリパーゼ」という用語は、リン脂質の炭素-酸素結合またはリン-酸素結合を加水分解することによってそのリン脂質を開裂させる酵素を意味する。ホスホリパーゼとしてはホスホリパーゼ $A_1$ 、 $A_2$ 、 $C$ 、および $D$ が挙げられるが、それらに限定されない。

本明細書中で用いられている「薬剤」という用語は、疾病または症状の診断、治療、または予防に用いられる物質または物質の集まりを意味する。薬剤は、それに暴露される生命体、組織、細胞、またはin vitroシステムの生理学的な要素を変えることによって働く。この用語は、抗菌性、抗真菌性および抗ウイルス性の化合物を含むがそれらに限定されない抗微生物剤をも包含することを意図している。またこの用語が、天然または合成の抗生物質、および組換えDNA技術によって産生された化合物をも包含することを意図している。

本明細書中で用いられている「ペプチド」という用語は、2個以上のアミノ酸から構成されるいかなる物質をも意味している。

本明細書中で用いられている「炭水化物」という用語は、あるクラスの分子であって、糖、デンプン、セルロース、キチン、グリコーゲン、および類似の構造のものを含むがそれらに限定されないものを意味する。炭水化物は糖脂質および糖タンパク質の構成成分としても存在することができる。

本明細書中で用いられている「発色団」という用語は、化合物、材料、または



サンプルの色にあずかる分子または分子群を意味する。

本明細書中で用いられている「抗原」という用語は、少なくとも1種の抗体に認識される分子または分子群を意味する。この定義によって抗原は少なくとも1つのエピトープ(すなわち抗体によって認識されうる特異的な生化学的単位)を有している。「免疫原」という用語は、抗体産生を誘発するいかなる分子、化合物、または凝集物をも意味する。この定義によって免疫原は少なくとも1つのエピトープ(すなわち免疫反応を引き起こしうる特異的な生化学的単位)を有する。

本明細書中で用いられている「キレート化合物」という用語は、閉環構造を完成させる配位結合からなるまたは配位結合を含むいかなる化合物をも意味する。この化合物は、その中の非金属イオンの少なくとも2個に配位結合で結合する金属イオンと結合することができる。

本明細書中で用いられている「分子認識複合体」という用語は、一つの分子を認識する(すなわち特異的にそれと相互作用する)ことのできる分子、分子群、または分子複合体のいかなるものも意味する。例えば受容体のリガンド結合部位は分子認識複合体とみなしうるであろう。

本明細書中で用いられている「周囲の条件」という用語は、周囲の環境条件(例えば実験が行われる室内または戸外の環境の気温)を意味する。

本明細書中で用いられている「室温」という用語は、技術的には約20から25℃の範囲の温度を意味する。しかし一般的にはこの用語は実験が行われる一般的なエリア内の周囲の温度のいかなるものをも意味する。

本明細書中で用いられている「ホームテストイング」および「現場テストイング」という用語は、実験室環境の外で行われる試験を意味する。そのような試験は屋内または屋外で、例えば個人の住宅、事業所、公有または私有地、車内、水中、および患者のベッドサイドなどで行いうる。

本明細書中で用いられている「脂質」という用語は、有機溶媒に可溶性であることを特徴とする各種の化合物を意味する。そのような化合物としては、脂肪、ロウ、ステロイド、ステロール、糖脂質、スフィンゴ糖脂質(ガングリオシドを含む)、リン脂質、テルペン、脂溶性ビタミン、プロスタグランジン、カロテン、およびクロロフィルがあるがそれらに限定されない。本明細書中で用いられて

いる

「脂質ベースの材料」という語句は脂質を含有するいかなる材料をも意味する。

本明細書中で用いられている「ウイルス」という用語は、微細な、感染性を持つものであって、例外はあるが光学顕微鏡では観察できず、独立した代謝系を欠き、生きている宿主細胞中でのみ複製しうるものを意味する。個々の粒子(すなわちビリオン)はタンパク質の殻またはコートと核酸からなっている；何種類かのビリオンは脂質を含む膜をも有している。「ウイルス」という用語は動物ウイルス、植物ウイルス、ファージ、およびその他のウイルスを含むすべてのタイプのウイルスを包含する。

本明細書中で用いられている「遊離浮遊凝集物」という語句は、固定化されていない凝集物を意味する。

本明細書中で用いられている「被包する」という用語は、被包用の材料中またはその上に被包される材料を固定化させるように2種以上の材料を包み込む、入れ子にする、又はそうでなければ会合する工程を意味する。

本明細書中で用いられている「光透過性」という用語は、あるものの特性を意味し、そのものは光を透過させることができ、それによってその光は目視的に光を検出できるもの(例えば目および検出器具)によって観察しうるものを意味する。

本明細書中で用いられている「生物学的に不活性」という用語は、材料の性質であってその材料が生物学的材料と化学的に反応しないことを意味する。

本明細書中で用いられている「有機溶媒」という用語は、別の物質を溶解することのできるいかなる有機分子をも意味する。例としてはクロロホルム、アルコール、フェノールおよびエーテルがあるがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「ナノ構造」という用語は、顕微鏡的構造であって典型的にはナノメートルスケールで測定される構造を意味する。そのような構造としては各種の三次元集合体であって、リポソーム、薄膜、多分子層、網状、ラメラ、らせん状、管状、および繊維様の形のもの、ならびにそれらの組み合わせがあるがそれらに限定されない。そのような構造は、いくつかの実施形態にお

いては、棒状およびコイル状などの凝集した形態の溶媒和ポリマーとして存在することができる。

本明細書中で用いられている「薄膜」または「フィルム」という用語は、薄い切片または層状で置かれるかまたは用いられるいかなる材料をも意味する。

本明細書中で用いられている「小胞」という用語は、小さな囲まれた構造を意味する。その構造はしばしば、脂質、タンパク質、糖脂質、ステロイドまたはその他の膜に関連する成分からなる膜である。小胞は天然に生じるか(例えば分子を輸送し特異的な細胞機能を分担する細胞質内に存在する小胞)または合成する(例えばリポソーム)。

本明細書中で用いられている「リポソーム」という用語は、人工的に製した球状の脂質複合体を意味し、それは水性媒質から分離するように誘導される。

本明細書中で用いられている「生体高分子性リポソーム」という用語は、完全にまたは部分的に生体高分子材料からなるリポソームを意味する。

本明細書中で用いられている「細管」という用語は、小さな中空の円筒状構造からなる材料を意味する。

本明細書中で用いられている「溶媒和ポリマー」「溶媒和棒」および「溶媒和コイル」という用語は、水性溶液に可溶性の重合材料を意味する。

本明細書中で用いられている「多分子層」という用語は、2つ以上の単分子層からなる構造を意味する。個々の単分子層は、互いに化学的に相互作用(例えば共有結合、イオン相互作用、ファンデルワールス力による相互作用、水素結合、疎水性または親水性集合体、および立体障害などによって)して新しい性質(すなわち単分子層のみの場合に持っていた性質とは異なる性質)を持つ薄膜(フィルム)が製される。

本明細書中で用いられている「自己集合性モノマー」および「脂質モノマー」という用語は、自発的に会合して分子の集合体を形成する分子を意味する。ある意味では、この用語は会合して界面活性剤分子集合体を形成する界面活性剤分子を意味することができる。「自己集合性モノマー」という用語には単分子(例えば単一の脂質分子)および小さな分子集合体(例えば重合した脂質)が含まれ、そ

れによって個々の小さな分子集合体がさらに凝集(例えば集合および重合)してより大きい分子集合体になりうる。「界面活性分子集合体」とは、反対の極性を有する化学的な基を含有し、相界面で一定の方向を向いた単分子層を形成し、ミセル(凝集コロイド中のコロイド粒子)を形成し、洗浄、発泡、湿潤化、乳化、および分散の

各特性を持つ界面活性剤の集合体を意味する。

本明細書中で用いられている「ホモポリマー」という用語は、単一タイプの重合分子種からなる材料を意味する。「混合ポリマー」という語句は2種以上のタイプの重合分子種からなる材料を意味する。

本明細書中で用いられている「リガンド」という用語は、イオン、分子、分子基、またはその他の物質であって別のものと結合してより大きな複合体を形成するいかなるものも意味する。リガンドの例としては、ペプチド、炭水化物、核酸、抗体、または受容体と結合するいかなる分子をも含むがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「ドーパント」という用語は、生体高分子材料に添加されてその材料の性質を変える分子を意味する。そのような性質としては比色応答、色調、感度、耐久性、強靱性、固定化のしやすさ、温度感受性、およびpH感受性などがあるがそれらに限定されない。微量添加物に用いられる材料としては、脂質、コレステロール、ステロイド、エルゴステロール、ポリエチレングリコール、タンパク質、ペプチド、または膜(例えばリポソームおよび薄膜)と会合しうるその他のいかなる分子(例えば界面活性剤、ポリソルベート、オクトキシノール、ドデシル硫酸ナトリウム、両イオン性洗剤、デシルグルコシド、デオキシコール酸、ジアセチレン誘導体、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルメタノール、カルジオリピン、セラミド、セレブロシド、リゾホスファチジルコリン、D-エリスロシンゴシン、スフィンゴミエリン、ドデシルホスホコリン、N-ビオチニルホスファチジルエタノールアミン、およびその他の合成または天然の細胞膜成分)がある。

がそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「有機マトリックス」および「生体マトリックス」という用語は、有機分子の集合体であって集合されてより大きな多分子構造となるものを意味する。そのような構造としては薄膜、単分子層、および2分子層があるがそれらに限定されない。本明細書中で用いられている「有機単分子層」という用語は、炭素をベースとする分子の単一の層からなる薄膜を意味する。ある実施形態においては、そのような単分子層は疎水性末端がその単分子層の片側に

整列する極性分子からなることができる。「単分子層集合体」という用語は単分子層からなる構造を意味する。「有機高分子マトリックス」という用語は有機マトリックスであってそのマトリックスの分子構成物の一部または全部が重合しているマトリックスを意味する。

本明細書中で用いられている「ヘッド基」および「ヘッド基機能」という用語は、分子の末端に存在する分子基(例えば脂肪酸の末端のカルボン酸基)を意味する。

本明細書中で用いられている「親水性ヘッド基」という用語は、分子の末端であって、水素結合、ファンデルワールス力、イオン性相互作用、または共有結合などで、それらに限定されないが、それらの化学的相互作用によって実質的に水に引きつけられる末端を意味する。本明細書中で用いられている「疎水性ヘッド基」という用語は、分子の末端であって、他の疎水性のものと自己会合し、その結果それらが水から排除されるものを意味する。

本明細書中で用いられている「カルボン酸ヘッド基」という用語は、分子の末端またはその近傍に位置している1つ以上のカルボキシル( $\text{-COOH}$ )基を含有する有機化合物を意味する。カルボン酸という用語は、遊離であるかあるいは塩またはエステルとして存在しているかどうかであるカルボキシル基を言う。

本明細書中で用いられている「検出性ヘッド基」という用語は、分子の末端にある分子基であってある成分(例えばアナライト)の検出に関与するものを意味している。

本明細書中で用いられている「リンカー」または「スペーサー分子」という用語は、一つのものを別のものと連結させる物質を意味している。ある意味では、2つ以上の他の分子を共有結合させる(例えば一つのリガンドを自己集合性モノマーと連結する)一つの分子または分子基はリンカーとなることができる。

本明細書中で用いられている「高分子集合体表面」という語句は、別の材料の集合に表面を提供する高分子材料を意味する(例えばリガンドの結合および集合に表面を提供する薄膜またはリポソームの生体高分子表面)。

本明細書中で用いられている「形成用担体」という用語は、材料の生産のために物理的な支持を提供するいかなる装置または構造も意味する。いくつかの実施

形態においては、形成用担体は薄膜を層状化および/または圧縮するための構造を提供する。

本明細書中で用いられている「ジアセチレンモノマー」という用語は、2つのアルキン架橋(すなわち炭素/炭素三重結合)を含有する炭化水素の単一のコピーを意味する。

本明細書中で用いられている「標準トラフ」および「標準ラングミュア-プロジェットトラフ」という用語は、ラングミュアフィルムを製造するために用いる、通常はテフロン製の装置を意味する。その装置は水性溶液を保持するためのレザバーおよびその水性溶液上に層状に置かれるフィルム材料を圧縮するための可動性の仕切りを有する(例えばRoberts, Langmuir-Blodgett Films, Plenum, New York, [1990]を参照せよ)。

本明細書中で用いられている「結晶形態」という用語は、結晶の形状と構造を意味し、それには結晶型、方向、組織、および大きさなどがあるがそれらに限定されない。

本明細書中で用いられている「ドメイン境界」という用語は、重合薄膜分子が均一に配向されているようなエリアの境界を意味する。例えば、ドメイン境界としては、周期的で規則的に配列されたポリジアセチレン材料の物理的構造(例えば線條、稜、および溝)である。

本明細書中で用いられている「ドメインサイズ」という用語は、ドメイン境界

間の典型的な長さを意味する。

ここで用いられている「結合(conjugated)主鎖」および「ポリマー主鎖」という用語は、重合ジアセチレン薄膜のエン-インポリマー主鎖であって巨視的には物理的な線条または稜の形状に見えるものを意味する。「ポリマー主鎖軸」という用語は結合主鎖と平行して走る想像上の線を意味する。「イントラ主鎖」および「インター主鎖」という用語は、ある与えられたポリマー主鎖中の領域、およびポリマー主鎖間の領域をそれぞれ意味する。主鎖は一連の線または「直線の線条」であって鋳型表面に沿って伸びるものを意味する。

ここで用いられている「結合」という用語は、分子内の原子間の連結および結晶中の分子とイオンとの間の連結を意味する。「一重結合」という用語は、2つの

電子が結合軌道を占めている結合を意味する。分子中の原子間の一重結合の記載法は2個の原子間に引かれた一本の線によって示される(例えば $C_8-C_9$ )。「二重結合」という用語は2つの電子のペアを共有する結合を意味する。二重結合は一重結合より強力で、より反応性に富む。「三重結合」という用語は3つの電子のペアを共有する結合を意味する。ここで用いられている「エン-イン」という用語は、二重結合と三重結合が相互に入れ替わることを意味している。ここで用いられている「アミン結合」、「チオール結合」、および「アルデヒド結合」という用語は、アミン基(すなわち、アンモニアの水素原子を1個以上炭化水素基で置換することによって得られた化学基)、チオール基(すなわち、アルコールのイオウアナログ)、およびアルデヒド基(すなわち、化学基 $-CHO$ が直接別の炭素原子とつながったもの)が、それぞれ別の原子または分子との間に形成されたいかなる結合をも意味する。

ここで用いられている「共有結合」という用語は、2つの原子間の連結であって2個の電子を共有しそのうちの1個ずつがそれぞれの原子から提供されたものであるものを意味する。

ここで用いられている「吸収」という用語は、ある意味では、光の吸収を意味する。光はサンプルから反射されないか、あるいはサンプルを透過しない場合は

、サンプルに吸収される。色のあるサンプルは、白色光の全波長のうち、そのサンプルの肉眼的に見える色に対応する波長を除くすべてを選択的に吸収する。

ここで用いられている「スペクトル」という用語は、波長の順に並べられた光エネルギーの分布を意味する。

ここで用いられている「可視スペクトル」という用語は、約360nmから約800nmまでの波長を含む光の放射を意味する。

ここで用いられている「紫外線照射」という用語は、可視光より短い(すなわち約360nm未満)がX線より長い波長(すなわち約0.1nmを超える)を持つ放射に対する暴露を意味する。紫外線放射は可視光より強力なエネルギーを持ち、従って光化学反応の誘発により有効である。

ここで用いられている「クロマチック転移」という用語は、可視光吸収の変化を引き起こす分子または材料の変化を意味する。いくつかの実施形態においては、

色の変化は、サンプルの光吸収の変化であってそれによってその変化に伴う検出可能な色の変化が起こるものを意味する。この検出は、肉眼的観察および分光分析を含むがそれらに限定されない各種の方法で行うことができる。

ここで用いられている「サーモクロマチック転移」という用語は、温度の変化によって開始される色の変化を意味する。

ここで用いられている「固相支持体」という用語は、サンプルがその上に重層されるかまたは付着される固体の物体または表面を意味する。固相支持体としては、とりわけ、ガラス、金属、ゲル、およびフィルターペーパーが挙げられるがそれらに限定されない。「疎水性固相支持体」とは、疎水性のものを引きつけ水をはじくように、化学的に処理された、またはそうなるように製された固相支持体を意味する。

ここで用いられている「薄膜周囲界面領域」という用語は、周囲の環境または雰囲気暴露された薄膜表面(すなわち、固相支持体と接触している表面ではない)を意味する。

ここで用いられている「形成用溶媒」という用語は、典型的には揮発性有機溶



媒であるが、材料を可溶化し希望する位置(例えば、薄膜を製するための表面へ、またはリポソーム材料を乾燥するために置かれるための乾燥容器へ)に分布させるために用いられるいかなる媒体をも意味する。

ここで用いられている「ミセル」という用語は、親水性の外面と疎水性の内面を有するコロイドの大きさの粒子を意味する。

ここで用いられている「トポ化学反応」という用語は、ある特定の場所(例えば分子内の特定の部分、または特定の分子の立体構造が存在するときのみ起こる反応)の内部で起こる反応を意味する。

ここで用いられている「型構造」という用語は、希望する形および大きさにデザインするための鋳型として用いられる固相支持体を意味する。

ここで用いられている「アレイ」および「パターン化されたアレイ」という用語は、要素(すなわちもの)の材料または装置へのアレンジメントを意味する。例えば、異なるアナライト認識基を有する数タイプの生体高分子材料を組み合わせることでアナライト検出装置とすることはアレイを構成する。

ここで用いられている「妨害物」という用語は、アナライトサンプル中に存在するものであって検出されるべきアナライトではないもので、好ましくは検出装置がそれを同定せず、またはアナライトとは区別しうると考えられるものを意味する。

ここで用いられている「バッジ」という用語は、携帯可能でアナライトを検出する環境下で働いている一人の人が持ち歩くまたは身に付けることのできるいかなる装置をも意味する。

ここで用いられている「装置」という用語は、生体高分子材料を含んでいるいかなる装置(例えば多ウエルのプレートおよびバッジ)をも意味する。その生体高分子材料は装置中に固定化あるいは取り込むことができる。一つの装置に1種以上のタイプの生体高分子材料を取り込むことができる。

ここで用いられている「ハロゲン化」という用語は、ハロゲン(すなわちフッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびアスタチンの各元素)を分子中に取り込むプロセスまたはその程度を意味する。

ここで用いられている「芳香族性」という用語は、芳香族基(すなわち六炭素環およびその誘導体)が分子中に存在することを意味する。

ここで用いられている「水不混和性溶媒」という用語は、どのような割合でも水に溶解しない溶媒を意味する。「水混和性溶媒」という語句は、どのような割合でも水に溶解する溶媒を意味する。

ここで用いられている「陽性」、「陰性」、および「両性イオン性」という用語は、分子または分子性の基であってそれぞれ全体として陽性、陰性、または中性の電荷を有するものを意味する。両性イオン性のものは陽性に荷電した、および陰性に荷電した原子または基を有し、その双方の電荷が打ち消されたものである(すなわちその全体としての電荷はゼロである)。

ここで用いられている「生物学的有機体」という用語は、炭素をベースとする生命体のいかなるものも意味する。

ここで用いられている「in situ」という用語は、プロセス、イベント、対象物、または情報が、それらの天然の環境の状況中に存在するかあるいはそこで起こるものを意味する。

ここで用いられている「水性」という用語は、他の構成成分もあるがとりわけ水を含む液体混合物を意味する。

ここで用いられている「固体状態」という用語は、1種以上の硬いまたは固体様の化合物を含む反応を意味する。

ここで用いられている「規則的に詰められた」という用語は、圧縮薄膜中の分子の周期的な配置を意味する。

ここで用いられている「ろ過」という用語は、供試サンプル中の各種の構成成分をお互いに分離する工程を意味する。ある実施形態においては、ろ過とは、膜または媒体を用いて液体または気体から固体を分離することを意味する。また別の実施形態においては、この用語は材料の分離がその相対的な大きさに基づいて行われることをも包含する。

ここで用いられている「阻害剤」という用語は、化学反応を遅くするまたは停止させる材料、サンプル、または物質を意味する。「反応法阻害剤」という用語

は、ある特定の反応法(例えば酵素)の活動または活性を遅らせるかまたは停止させることのできる阻害剤を意味する。

ここで用いられている「阻害剤スクリーニング」という用語は、阻害剤を同定するおよび/または特性を調べるために用いられるいかなる方法も意味する。好ましくは阻害剤スクリーニング法は「高スループットスクリーニング」、すなわち阻害剤を含んでいる可能性のある多数のサンプルを短時間のうちにスクリーニングする能力を提供することである。また、阻害剤スクリーニング法が、阻害剤の効率の比較を提供するための量的な結果を提供することが望ましいであろう。

ここで用いられている「サンプル」という用語は、その広義の意味で用いられる。ある意味ではその用語は生体高分子材料を意味することができる。別の意味では、その用語は、いかなるソースから得られた検体または培養液、および生物学および環境サンプルを含むことを意味する。生物学的サンプルは動物(ヒトを含む)から得ることができ、また液体、固体、組織、および気体をも包含する。生物学的サンプルとしては、血漿、血清およびそれに類似の血液産物が含まれる。環境サンプルとしては表面材料、土壌、水、結晶、および産業サンプルなどの環境材料が含まれる。これらの例示は本発明で応用可能なサンプルのタイプを限定

するものとして解釈されるべきものではない。

#### 本発明の概略的な説明

本発明は生体高分子材料の色の変化を検出することによって膜のコンホメーションの変化を直接検出するための方法および組成物に関する。とりわけ、本発明によって、膜を改変する反応およびそのような改変にあずかるアナライトの比色による直接的検出および反応阻害剤のスクリーニングが可能となる。生体高分子材料からなる膜構造の崩壊が起こると、その材料は検出可能な(例えば肉眼的に検出可能な)色の変化を生ずる。本発明は、とりわけ、脂質開裂、重合、脂質フリッピング、膜透過シグナル伝達、小胞形成、脂質化、グリコシル化、イオンチャンネル化、分子の再構成、およびリン酸化などを含むがそれらに限定されない各種の膜崩壊イベントの比色による直接的検出法を提供する。訓練を受けていな

い観察者であっても実験を行い結果を判定することができ、それらの方法は周囲の条件下で行うことができるので、それらの方法を、家庭診断用、フィールドワーク用、空中または水中の材料の検出用、軍所用、医局または現場用、およびその他の多数の用途を含むがそれらに限定されない多数の使用法に使用可能なものとしている。本発明は、エネルギー源を必要とせず、安価、安定、正確、高信頼性、変動のない、強靱な検出技法を提供する。これらの性能の向上によって、新規化合物ライブラリーのスクリーニング(例えば薬剤スクリーニング)、酵素阻害剤の同定と特徴を調べること、薬剤の試験、水道の試験、および迅速で正確な比色スクリーニングが望ましいいかなる用途にも、理想的な基礎を提供する。

好ましい実施形態では、本発明の生体高分子材料は、天然の酵素基質を取り囲むジアセチレン「シグナルを発している」脂質の色の変化を検出することにより酵素活性を一段階で測定する方法を提供する。この仕組みは化学試薬の追加や加水分解後の分析法を必要としない。さらに、酵素阻害剤の同定は標準的な96ウェルのマイクロタイタープレートまたはそれと同等のものの中の水性小胞懸濁液の色の変化をモニターするのみで迅速に行いうる。

ポリジアセチレン(PDA)、ポリチオフェン、およびポリピロールなどの結合ポリマー(CP)は、温度変化(サーモクロミズム)(Levesque and Leclerc, Chem.

Mater. 8, 2843[1996])、機械的なストレス(メカクロミズム)(Galiotisら, J. Polymer Science 21, 2483[1983])、またはイオンの結合(イオノクロミズム)(Levesque, 同上; およびMarsellaら, Am.Chem.Soc.117,9842[1995])から生ずる色の一連の変化を示す。色の変化は、非局在化された $\pi$ -結合ポリマーの主鎖の有効結合長の変化に帰することができる(Tanakaら, Macromolecules 22,1208[1989])。これらの”頭の良い”材料の生物学的ターゲットの検出(バイオクロミズム)(例えばCharychら, Chemistry & Biology 3,113[1996]; Reichertら, J.Am.Chem.Soc.117,829[1995]; Charychら, Science 261,585[1993]; Pan and Charych, Langmuir 13, 1365[1997]; Cheng and Stevens, Chemistry and Physics of Lipids 87,41[1997]; およびCheng and Stevens, Advanced Materials 9,481[1997]を参照せよ)への応用は、検討されはじめたところである。これらの材料は迅速な応答時

間、選択性、および容易にモニターできる光学的シグナルを示す。溶液中の遊離浮遊凝集物として、これらの脂質ベースの検出剤は単純なアッセイシステムとなる見込みがある。固定化薄膜、リポソーム、またはその他の形態をとってこれらの検出剤は、小さい検出装置(例えば検出用バッジ)中に容易に組み込みうる、耐久性のある強靱な比色センサーを提供する。

他の重合脂質ベースの技術(例えば米国特許No.5,268,305およびNo.4,859,538を参照せよ)とは異なり、本発明の方法と組成物はポリマー材料の肉眼的に検出可能な色の変化を提供し、変換装置の使用を必要としない。その他の技術では、ポリマー材料中の変化を同定し、信号に翻訳し、人間が読み取り理解できるような情報に変換するための測光法、蛍光測定法、化学ルミネセンスを用いる装置、光ファイバー、格子結合器、表面プラズモン共鳴、電位差測定および電流測定電極、電界効果トランジスタ、圧電センシング、又は弾性表面波(SAW)などを用いる変換装置と併用される脂質材料に依存している。これらの装置には、変換装置、それは小型化を妨げ動力源を必要とするが、その変換装置に依存していることなどの大きな弱点がある。これらの不利な点のためにこれらの装置は複雑すぎ、高価で、フィールドワークや家庭での使用などの通常の検出用途の多くに対して取り扱いし得ないものとなる。さらに、これらの装置の多くは安定性に欠けることおよび生物材料の入手が困難なことから、その使用は限定されたもの

となる。

いくつかの実施形態においては、本発明は、ホスホリパーゼ $A_2$  (PLA $_2$ )などの界面酵素によるPDA-小胞の化学修飾からなる新規のバイオクロマティックな検出法を提供している。これらの方法はバイオクロミック効果を誘導する新しい経路を提供している。好ましい実施形態においては、小胞溶液の色の変化は、PDAマトリックス中にあらかじめ包埋させておいた天然の非標識酵素基質の加水分解によって引き起こされる。その他の実施形態においては、本発明はPDA小胞のバイオクロマティック転移が、既知のホスホリパーゼ阻害剤の添加によって抑制されることを示し、高スループットの薬剤発見への応用を提供している。

本発明はまた、生体高分子材料の個々のセクションが異なる反応に対してある

いはある一つの反応に対して異なる応答をすることができるように、単一の装置に取り込まれた生体高分子材料の配列を提供する。そのような配列はある特定の反応の存在がその装置中の既知の位置に色の変化を生ずるか、あるいはその与えられた反応に特異的な色の変化(例えば反応Xでは紫色からオレンジ色へ、反応Yでは青色から赤色へ)を生ずるようにデザインしうる。特定の物質、化合物、または反応の存在を示すために「+」のような容易に理解しうる印を含む配列を用いることも本発明には含まれている。本発明が特定の配列デザインまたは配置構成に限定されることは意図していない。

本発明は現在利用可能な各種技術の多数の不利な点(例えば間接的な検出、サンプルの精製、コスト、および放射活性またはその他の有害材料の使用など)を克服することのできる、膜の再配列の特徴を明らかにしうる方法と組成物を提供する。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、膜の再配列(例えば脂質開裂)に応じて色を変える生体高分子材料に関する方法と組成物からなる。これらの生体高分子材料は、薄膜、小胞、細管構造、多層構造、ならびに溶媒和棒およびコイルなどがあるがそれらに限定されない多数の形態を含む。これらの材料は重合した自己集合性モノマーを含む。いくつかの実施形態においては、生体高分子材料は2種以上の自己集合性モノマーを含む。これらの自己集合性モノマーのうちのいくつかは重合可能な基を欠いてい

る。他の実施形態においては、その材料はさらに、センサーの性質を変えるドーパントを含む。ドーパントとしては重合可能な自己集合性モノマー、非重合性自己集合性モノマー、脂質、ステロール、膜構成成分、および生体高分子材料を最適化(例えば材料の安定性、耐久性、比色応答性、および固定化の容易性)するその他のいかなる分子をも含むがそれらに限定されない。生体高分子材料はさらにリガンド(例えばタンパク質、抗体、炭水化物、および核酸)を含むことができる。リガンドは分子を生体高分子性表面に供給するための付着部位を提供するか、またはアナライトの結合部位としてその部位での結合イベントが生体高分子材料に色の変化を起こす部位として用いうる。本発明の各種の実施形態は、広範囲の

反応およびアナライトを比色法で検出する能力を提供する。特定の生体高分子材料を用いれば、反応に応じる色の変化は単純な肉眼的観察か、または、所望により、色調センシング機器で見ることができる。本発明はさらに生体高分子材料を固定化する各種の方法を提供し、固定化によって安定性、耐久性、および取り扱いと使用の容易性が得られる。いくつかの実施形態においては、各種の異なる生体高分子材料を組み合わせてある配列を作るための単一の装置とする。その配列は、反応またはアナライトの異なるタイプまたは量を検出し区別しうる様にデザインしうる(すなわち、その配列は定量的および/または定性的データを提供しうる)。本発明の方法と組成物は広範囲のアナライト検出環境で用いることができ、とりわけ単純で、迅速、正確、安価な検出法が要求されるような状況で用いることができる。

本発明の説明は次の事項：I. 生体高分子材料の形態；II. 自己集合性モノマー；III. ドーパント；IV. リガンド；V. 色の変化の検出；VI. 膜のコンホメーション変化の検出；VII. 生体高分子材料の固定化；およびVIII. 配列、に分けられる。これらの各節に記載されている生体高分子材料はアナライト(例えば病原体、化学物質、およびタンパク質)の存在を検出できるようにデザインしうるか、または膜の再配列(例えば脂質開裂イベント)を検出するようにデザインしうる。いくつかの実施形態においては、これらの機能の双方を備えているような生体高分子材料であることが望ましいであろう。アナライトまたは膜の再配列の検出に際して生

体高分子材料を最適化(例えば比色応答性、色、および安定性の最適化)すると、通常はしばしばその双方のシナリオに適用可能となる。相違する点がある場合には記載している。

#### I 生体高分子材料の形態

本発明の生体高分子材料はリポソーム、薄膜、および多層構造、さらに網状、ラメラ、らせん状、細管、繊維様の形を含むがそれらに限定されない多数の形態をとることができる。いくつかの実施形態においては、生体高分子材料は棒状およびコイル状などの凝集した形態の溶媒和ポリマーである。それらのそれぞれに

については、それらの利点とこれらの材料の開発中に克服した欠点とに焦点を当てて下に述べる。

#### A. 薄膜

いくつかの実施形態においては、本発明の生体高分子材料は生体高分子薄膜をなす。実施例1に記載のとおり、生体高分子薄膜は所望のマトリックス形成材料(例えば自己集合性有機モノマー)を形成用支持体上に重層することによって調製される。好ましい実施形態においては、形成用支持体は標準ラングミュア-ブロッジエットトラフ(Langmuir-Blodgett trough)であり、マトリックス形成材料はトラフを水性溶液で満たすことによって作られた水性表面上に重層される。その材料を圧縮し重合して生体高分子薄膜を形成させる。好ましい実施形態においては、その圧縮は標準ラングミュア-ブロッジエットトラフ中でマトリックス形成材料を圧縮するために可動性バリアを用いて行った。圧縮はタイトにパックしたマトリックス形成材料の単分子層が形成されるまで行った。薄膜はアナライトの非常に高感度の比色分析用スクリーンを提供する。

実施例1に記載のとおり、いくつかの実施形態では、形成用支持体中に位置しているマトリックス形成材料は紫外線照射によって重合される。重合の方法はすべて本発明によって包含されており、ガンマ線照射、X線照射、化学的架橋、および電子ビーム暴露があるがそれらに限定されない。

いくつかの実施形態においては、ジアセチレンモノマー(DA)が自己集合性モノマーとして用いられた。そのジアセチレンモノマー(DA)を紫外線照射を用いて重合させてポリジアセチレン(p-PDAまたはPDA)とした。好ましい実施形態においては、紫外線照射源は、薄膜に熱によるダメージが起こることを避けるために薄膜から十分離しておいた。ポリマー性薄膜の結晶形態は光学顕微鏡の直交した偏光板間に容易に観察しうるが、本発明ではこのステップは要求されない。重合化後に生ずる二重結合と三重結合が交互に入れ替わる結合主鎖(すなわちエン-イン)は可視スペクトルに強度の吸収を生じ、重合ジアセチレン薄膜に特有の青/紫の外観を示すようになる。

ある実施形態においては、さらに分析するためにカルボン酸先端基が薄膜周囲



環境界面領域で暴露されるように、肉眼的に青色の薄膜を疎水性の固相支持体へ移転した(Charychら, Science 261:585[1993])。但し、そのステップは本発明の方法では必要とされてはいない。PDA薄膜に典型的な直線的な線条が、偏光顕微鏡で観察することができる。この材料は電子顕微鏡またはその他の特性を検討する方法を用いて特徴を調べることもできる(例えば実施例2を参照せよ)。

当業界では薄膜を作る方法としていくつかのその他の方法も知られており、本発明にはその他の薄膜を製する方法はすべてその意図するところに含んでいる。例えば、薄膜は溶剤ケーシング(すなわち溶剤の緩徐な蒸発)によって製することができる。また、脂質モノマーは、シランまたはチオールアンカリング基を用いて製することにより、固相支持体を溶液中へ浸漬してコートされた固相支持体を作ることができる。ジアセチレンモノマーはシランおよびチオール基によってつなぎ止められ、次いで重合される。この方法ではトラフは必要としない。

#### B. リポソーム

他の実施形態においては、本発明の生体高分子材料は生体高分子性リポソームを含む。リポソームを製するいかなる方法も本発明の意図するところに含まれてはいるが、リポソームはプローブ超音波処理法で調製した(New, Liposomes: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp33-104[1990])。自己集合性モノマーは、それ単独であるいは所望のリガンドと会合させて、形成用溶

媒を除去するために乾燥し、脱イオン水中に再懸濁した。その懸濁液をプローブで超音波処理し重合させた。その結果得られたリポソーム溶液は生体高分子性リポソームを含んでいた。

リポソームは、その物理的性質およびそれを製するために必要な方法の双方の点で単分子層および薄膜とは異なっている。両親媒性化合物から作られる単分子層および薄膜(または多分子層)は平坦な膜であり、2次元構造を形成する。単分子層および薄膜は、この関係では、図1に示すように、下敷きとなっている固形物によって支えられている固体材料である。薄膜Yは中心対称の多層薄膜であり、薄膜XおよびZは非中心対称の多分子層である。このような材料は多数の文献に記載されておりUlman(Ulman, An Introduction to Ultrathin Organic Films:

From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, Academic Press Inc., Boston, [1991])、およびGaines(Gaines, Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Interscience Publishers, New York, [1966])などで総説されている。薄膜および単分子層に比べると、リポソームは図2に示すとおり、水性のスペースを囲い込む三次元的小胞である。図2はA)断面の2次元図、およびB)リポソームの半分の3次元図を示す。これらの材料については多数の文献に記載されており、とりわけNew(New, Liposomes: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, [1989])およびRosoff(Rosoff, Vesicles, Marcel Dekker, Inc., New York, [1996])などで総説されている。リポソームはその水性コンパートメント中に材料を包み込むように構築することができる。薄膜および単分子層は水性スペースを囲い込むことがなく、コンパートメント内で材料を包み込まない。リポソームは典型的には同じ材料から作られた薄膜より安定で強靱である。

リポソームおよび薄膜は異なる方法で調製される。リポソームは両親媒性な分子の水性メディア中での分散によって調製され液相中にとどまる。これに対して、単分子層および薄膜は、空気-水界面領域のところで両親媒性な分子を固定化することによって調製される。ついで固相支持体をその界面領域を通過させて薄膜を固相支持体へ移送する。リポソームは均一な水性懸濁液中に存在し、球状、楕円形、正方形、長方形、および細管状などの多種類の形に製しうる。従って、リポソームの表面は液体-主に水のみと接触する。いくつかの観点においては、リポ

ソームは天然の細胞膜の3次元構造と類似している。リポソームを乾燥させて固体状態にするとリポソームはその形状を失い、リポソーム状態としてはもはや存在し得ない(すなわちもはや「リポソーム」ではない)。これに対して、薄膜は固相支持体上に固定化された平坦な不均一なコーティングとして存在する。単分子層または薄膜の表面は空気、その他の気体、または他の液体と接触させることができる。薄膜は空気中で乾燥することができ、その平坦な単分子層または多層構造を維持し、従って「薄膜」であることに変わりはない。

リポソーム溶液では単分子層アセンブリーに比較してその断面の密度がより大

きいため、重合した材料の濃度をはるかに高くすることができる。通常は、リポソームは色の変化をより肉眼的に見分けやすくし、比色応答を増大させるという利点を有する(例えば、図3は固定化シアル酸含有リポソーム(1)、薄膜(2)のインフルエンザウイルスの存在に対する比色応答を示している)。

本発明のリポソームを製する方法をデザインする際には、いくつかの困難を克服せねばならなかった。当初はリポソームは、各種の薄膜を製する実施形態(すなわち上述のおよび実施例1に記載の本発明の薄膜の実施形態)で用いられている自己集合性モノマー材料(例えばジアセチレン)を用いて製することができると期待していたが、このことが可能であるか否かは、主としてリポソームと薄膜の構造が異なるため、未知であった。リポソームは2次元的なものではなく3次元である。従って、1)ジアセチレン化脂質が実際にリポソームを形成するのか、2)その脂質がリポソームを形成することが可能ならばそれは重合するのか、及び/又は3)それが重合したとしてそれは比色特性を示すのかという点については明瞭ではなかった。

第1の点に関しては、一重鎖のジアセチレン化脂質が実際にリポソームを形成するのか明確ではなかった。なぜならば、文献の大多数は、一重鎖の分子はミセル(すなわち緩くバックされた単一の2分子層の懸濁液)を形成する傾向があり、一方、二重鎖の分子のみがリポソームを形成しうることを示していたからである。さらに、New(New, 同上)が述べているように、本発明のジアセチレン化脂質とは異なり、リポソーム形成に用いられる二重鎖分子は典型的には天然の細胞膜から由来したもので、通常はホスホジグリセリドおよびスフィンゴリピドなどの分

子状構成成分を取り込んだ古典的なリン脂質構造を有する。

最初はジアセチレン化脂質でのリポソーム形成を、激しく攪拌したり浸漬超音波処理などの標準的な方法で試した(すなわち、通常リン脂質に適用される方法と類似の方法)。これらの方法ではリポソームを形成することができず、不溶性で分散しておらず、特徴のない混合物が形成された。この混合物は比色できる性質を示さなかった。差動スキャンニングカロリーメトリーを用いて脂質の $T_m$ (主相転移温度)がそれらの天然のリン脂質の対応するものよりずっと高いことが測定

された。例えば、図4は、リジンを誘導体としたPDAモノマーから製した重合していないリポソームに対する大きな主相転移を示す加熱曲線を示している。従って、超音波プローブ処理および加熱などのより高エネルギーの方法を採用して、温度を $T_m$ より高くし、脂質を分散させることが必要であった。これらの条件下(例えば実施例1に記載の条件)ではリポソームは形成され、それは光散乱および透過型電子顕微鏡でリポソームのサイズ(すなわち約100nm)であると確認された。

第2の点に関しては、重合させるには脂質がお互いに、ある精密な間隔と方向でパックされる必要がある。従って、ポリジアセチレンの重合は「固体状態」またはトポ化学的な重合である。このことが分子が架橋するには密にパックされていなければならない理由である。この精密なパッキングは、単分子層および薄膜では空気-水界面領域のところでラングミュア装置(薄膜を図5に示すような所望のパッキングに圧縮するものであり、その中で圧縮された薄膜は垂直プレートに移送される。)の可動性バリアを用いて制御できる。リポソーム形成の場合はそのような外部からの圧縮は不可能である。脂質は集合され、お互いに平衡状態となる間隔と方向での位置に納まる。従って、本発明の開発以前には、リポソーム材料中での分子間の距離とパッキング状態が、重合反応が起こるために十分なものであるかどうかは明確ではなかった。

最初は、もっとも困難な点はリポソームジアセチレン化脂質モノマーを架橋してポリジアセチレン結合ポリマー(すなわち重合リポソーム)を製することであった。所望の色、およびアナライトがそのリポソームに結合することによって生ずる肉眼で確認しうる色の変化によって生物学的アナライトが検出できるようにしたりリポソームを提供したのは、結合ポリマー主鎖であった。しかし、リポソーム

が形成され(すなわち上述の方法を用いて)、室温まで冷却された後に、紫外線に暴露させてみるとそれらが全く重合しないことが判明した。原則的には、脂質は室温まで冷却した場合には結晶化しその固体様状態に戻るはずであったので(すなわち脂質はひとたびこの状態に戻れば上述のようなトポ化学的重合を行うはずであったのだが)、このことは驚くべきことであった。しかし、そうではなく、

明らかに脂質は依然として液体であった。さらに透過型電子顕微鏡による分析ではリポソームが結晶化していないことが示された。これらの室温（で調製した）リポソームは凝集してより大きな球状体となり、図6の顕微鏡図に示すとおり、非安定化液相リポソームの特徴を示した。これらの観察結果に基づき、これらの材料の加熱/冷却曲線にはヒステリシス効果があるのではないかとの仮説が立てられた。このことが正しいことが明らかとなり、それが「超冷却」法の開発につながった。超冷却法では、リポソームは4℃に冷却され、その結果、脂質の結晶化に成功した。冷却ステップを行った後、リポソームは室温に戻しても重合していることが見出された。重合は材料の青色、および約630nmの吸収によって確認された。超冷却しなかったリポソームに比べ、これらのリポソームは図7の顕微鏡図に示すとおり、正方形、長方形、楕円形、または球状に結晶化し、その構造をずっと維持した。

本発明の各種の実施形態（すなわち上述の実験）としての、適切なリポソームを製する上述の実験の全ては、薄膜を製するために用いられる方法と直接的な対比をなす。薄膜は同じ温度（すなわち周囲温度）で形成され重合される。

第3の点に関しては、重合リポソームを用いても、本発明の開発以前には、生体高分子性膜の崩壊に応じて色の変化を示すかどうかは未知であった。例えば、リポソームの異なる脂質パッキング構造が、薄膜実施形態で観察しうる色の変化を起こすかどうかは知られていなかった。さらに実験を行ったことによってアナライトの比色検出のために最適なリポソームが開発された。

### C. 他の形態

他の実施形態では、加熱および冷却速度、攪拌法、ならびに生体高分子材料の材料の変形が他のナノ構造を提供することが意図される。このようなナノ構造は、

限定されるものでないが、多層、編みひも、ラメラ、らせん状、細管状(tubular)、および繊維様形状、ならびにそれらの組合わせを含む。ある実施形態では、このような構造は棒およびコイルのような凝集形態の溶媒和ポリマー (solvated polymer) であることができる。例えば、モノマーの鎖長が、溶液中で形成する

凝集体のタイプに影響することが示されている(OkahataおよびKunitake, J. Am. Chem. Soc. 101:5231[1979])。界面活性物質によるこれらの他の形態の作製は、2本鎖(Kuoら, Macromolecule 23:3225[1990])、ラメラ(Rhodesら, Langmuir 10:267[1994])、中空細管および編みひも(Frankeら, J. Am. Chem. Soc. 116[1994])について記載されている。ある実施形態では、比色細管が作製された。実施例1に記載されたように、細管は、音波処理(sonication)前に1~10%の有機溶媒(例えばエタノール)を溶液に加えたことを除くと、リポソームと同様に調製された。本発明は、所望の特定の使用に適切な他の形状も意図する。

他の実施形態では、ポリチオフェンの可溶ポリマーを作製することができる。ある実施形態では、糖基、ペプチド、もしくは他のリガンドをチオフェン誘導体として合成し、その後コポリマーとして重合させることができる。代わりに、チオフェンのNHS誘導体を重合し、(以下に記載したように)ポリマーが形成した後、リガンド基を付着させることができる。チオフェンポリマーは酸基を付加して水溶化させる。このようにして、これらを水溶液に自由に溶解するように合成し、比色溶液を作製することができる。

## II. 自己集合性モノマー

ある特定の実施形態では、本発明は、生体高分子材料の形成に適した様々な自己集合性モノマー(self-assembling monomer)を意図する。かかるモノマーは、限定されるものでないが、アセチレン、ジアセチレン(例えば、5,7-ドコサジイン酸、5,7-ペンタコサジイン酸、および10,12-ペンタコサジイン酸)、アルケン、チオフェン、ポリチオフェン、イミド、アクリルアミド、メタクリレート、ビニルエーテル、無水マレイン酸、ウレタン、アシルアミン、シロキサン、ポリシラン、アニリン、ピロール、ポリアセチレン、ポリ(パラフェニレンビニレン)、ポ

リ(パラフィレン)、およびビニルピリジニウムを含む。これらの基を含有する脂質はホモポリマーもしくは混合ポリマーであることができる。さらに、限定されるものでないが、カルボン酸、ヒドロキシル基、一級アミン官能基、アミノ酸誘導体、および疎水基を含む、様々なヘッド基をもつモノマーが意図される。ある

特定のヘッド基はアナライトに結合する認識部位として作用し、アナライトに生体高分子材料を曝露するだけで直接比色検出を可能とする。

本発明の生体高分子材料は、（例えば、全てが5,7-ペンタコサジイン酸で作られた）単一種の自己集合性モノマーを含んでなくても、または2つ以上の種を含んでなくてもよい。生体高分子材料を1つ以上のタイプの自己集合性モノマーで作るためには、個々のモノマーを含有する溶媒を所望のモル比で組合わせる。その後、この混合物を上に記載したとおり（例えば、薄膜調製にはラングミュア・プロジェクト（Langmuir-Blodgett）装置の水表面上に層形成させるか、またはリポソーム調製には蒸発させて水溶液に再懸濁させて）調製する。ある実施形態では、自己集合性モノマーは他の分子（例えばリガンド）と化学的に結合させることができる。

好ましい実施形態では、ジアセチレンモノマーが本発明の生体高分子材料の自己集合性モノマーとして使われる。本発明は、限定されるものではないが、5,7-ドコサジイン酸(5,7-DCDA)、5,7-ペンタコサジイン酸(5,7-PCA)、および10,12-ペンタコサジイン酸(10,12-PCA)を含む様々なジアセチレンを含むことを意図する。

本発明は、さらに、所与の反応条件に対する応答を最大化する生体高分子材料の最適化を意図する。本発明を使用するためにその機構を理解することは必要でなく、そして本発明はそれによって限定されるものではないが、生体高分子材料に使われる特定の脂質の化学が比色転移感度の増加または低下に重要な役割を果たすことが意図される。例えば、発色団ポリマー主鎖の位置変化は所与のアナライトに対する感度を変えることができる。これは、（10,12-ペンタコサジイン酸と対比して）5,7-ペンタコサジイン酸を示す図8に例示したように、ジアセチレン基を界面領域により近く移動することにより達成することができる。ある実施形態では、重合可能基の配置をモノマー中の5,7位に変えることにより、比色感度

は著しく改善した（例えば実施例3を参照）。さらに、PDAの鎖長の短いまたは長いということが、おそらくは充填の変化によって、アナライト検出用生体高分子

材料の感度に影響をあたえることが示された。あるアナライト検出実施様態では、このような感度の改善により、小さいアナライト（例えば、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）由来のコレラ毒素および百日咳毒素のような細菌毒素、ならびに抗体）の検出を可能とした。さらなる最適化により、多くの反応、転位およびアナライトの検出用の感受性材料を作製することが意図される。

#### A. モノマー炭素鎖内の重合可能基の配置

ヘッド基を最終ポリマー材料のポリマー主鎖から特定距離に位置させる炭素鎖長は、未集合モノマー内の重合可能基の位置に依存する。ジアセチレンリポソームの場合、アナライト検出に使うときに、ジアセチレン基の位置がモノマーの18～20位間から3～5位へ移るにしたがって、次第により高い感度のリポソームを生成したことが示されている。10～12位から4～6位のジアセチレン基をもつモノマーから作られたリポソームは、特に感度を効率的に制御することができる。コレラ毒素検出のようなある特定の実施様態では、ほぼ5～7位に位置するジアセチレン基が好ましい。モノマーの製造プロトコルが、最終モノマー産物のどの位置にジアセチレン基が配置されるかを決定する。

#### B. 全炭素鎖長

未構成モノマーの全炭素鎖長もリポソーム生成物の感度レベルに影響するが、その程度はモノマー炭素鎖における重合可能基の位置より小さい。アナライトを検出する実施様態では、典型的には、短い鎖長ほど大きい感度をあたえる。本発明比色リポソームの構築に理想的に有用なモノマーは、長さで $C_{12}$ ～ $C_{25}$ の範囲でありうるが、本発明によればそれより長いおよび短い鎖長の両方が意図される。本発明のモノマー炭素鎖長の好ましい範囲の1つは、 $C_{20}$ ～ $C_{23}$ である。

モノマー鎖長および鎖上の重合可能基位置の影響は、複数の実験で実証されている。10,12-ジアセチレン誘導体の事例では、 $C_{23}$ 鎖は、 $C_{25}$ 鎖をもつモノマーから作られたものより低いアナライトレベルで変色する最終比色リポソーム産物を

あたえることが示された。5,7-ジアセチレン誘導体の場合、 $C_{12}$ 長の鎖が $C_{14}$ 長の鎖より大きい感度をあたえた。このように、鎖長は目的の最適検出条件に適切であるように設計される。



### III. ドーパント

本発明の生体高分子材料は、さらに、1つ以上のドーパント (dopant) 物質を含んでなることができる。ドーパントは生体高分子材料の所望の物性を変更し最適化するために含ませる。このような物性は、限定されるものでないが、比色応答、色、感度、耐久性、堅牢性、固定に対する順応、温度感度、およびpH感度を含む。ドーパント物質は、限定されるものでないが、脂質、コレステロール、ステロイド、エルゴステロール、ポリエチレングリコール、タンパク質、ペプチド、または膜（例えば、リポソームおよび薄膜）と結合可能な他の分子（例えば、界面活性剤、ポリソルベート、オクトキシノール、ドデシル硫酸ナトリウム、双生イオン洗剤、デシルグリコシド、デオキシコレート、ジアセチレン誘導体、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルメタノール、カルジオリピン、セラミド、セレブロシド、リゾホスファチジルコリン、D-エリスロシンゴシン、スフィンゴミエリン、ドデシルホスホコリン、N-ビオチニルホスファチジルエタノールアミン、および他の合成もしくは天然の細胞膜成分）を含む。例えば、実施例4に提供される実施様態は、シアル酸誘導体化ジアセチレンモノマーをガングリオシドおよびPDAを含んでなるリポソームに添加すると、低レベルのアナライトの検出に対する比色感度および定量性に著しい増加をもたらすことを実証する。ドーピングしてない物質が弱いシグナルしか生じないときに、ドーパントを使うこの比色応答の改良は、非常に便益がある。標的脂質（例えば、リガンドを含有するかまたは酵素反応の基質である脂質）がポリマー主鎖に共役結合してないとき（例えば、ガングリオシドリガンド）には、このようなことがしばしば起こる。

ある実施様態では、生体高分子材料の色を変えるためにドーパントを添加する。例えば、本発明は、青から赤へだけでなく、青からオレンジ、紫から赤、紫から

オレンジ、緑から赤、および緑からオレンジへ変わるリポソームも提供する。例えば、グルタミン誘導体化PDAは非常に暗い青（すなわちほとんど黒）のリポソ

ームを生成した。他の実施様態では、重合前にアニーリング（すなわち、ほぼ80℃に加熱して）と冷却（すなわち常温）のサイクルによって緑のリポソームが作られた。多色手法による利点は、ある特定の反応が材料をある特異の色に変えるセンサーを作ることができることにある。

異なるドーパント物質を単一の生体高分子材料調製に組み合わせることができる。例えば、本発明は、グルコースとシアル酸誘導体化ポリジアセチレン成分の混合物であるドーパントカクテルを提供する。ドーパント混合物のグルコース成分は主に本発明のリポソームの表面への非特異的接着を防止する作用を果たすようであり、感度も増強することができる。ポリジアセチレンに結合したシアル酸成分は機能的に表面を不安定化してアナライト検出の感度を著しく増加するようである。この共ドーパント (co-dopant) 手法を使うことにより、生体高分子材料の構造完全性を不要に低下させることなく、接着の特異性と感度の両方を最適化することができる。

本発明を使用する目的にその機構を理解する必要はなく、そして本発明を限定するものではないが、ドーパントの添加は色転移の活性化バリエーションを低下させ、および／または（もしリガンドが存在すれば）リガンドと結合主鎖の間の結合を提供して、比色転移を誘起する反応を可能とすることが意図される。本発明の開発中に明らかにされた1つの理論は、大きなヘッド基（例えば、シアル酸誘導体化脂質モノマー）をもつドーパントは基質表面で様々な溶媒相互作用を受け、青薄膜構造が不安定化し、その結果、局在する膜転位 (membrane rearrangement) によりあたえられる相対的に小さい揺れ (perturbation) が可能となって、比色転移を完了する。大きなヘッド基をもつドーパントを使って観察される比色応答の改良に対する他の可能な説明は、分子認識現象（すなわちアナライトもしくは他分子の生体高分子材料との相互作用）により誘起される立体効果がドーパントのヘッド基を妨害し、そしてアナライトにより引き起こされた揺れを伝播しうることである。

ある特定の実施様態では、ドーパントはジアセチレンもしくは修正したジアセチレン（例えば、シアル酸誘導体化ジアセチレン）を含んでなる。この事例では

、誘導された脂質が生体高分子材料の物性を修正するために使われ、（例えば、インフルエンザウイルスを検出するために使われるシアル酸リガンドの事例のように）アナライト検出のための認識部位に使われないことに注意すべきである。例えば、シアル酸誘導体化モノマーまたはラクトース誘導体化モノマーのみを含むジアセチレン系のポリマー材料は神経毒（例えば、ボツリヌス神経毒素(*botulinum neurotoxin*)) に応答せず、神経毒と誘導体化ジアセチレン脂質の間の相互作用は色変化を誘起するには不十分であることを示す。しかし、同じ物質が神経毒に対して親和性をもつリガンド（例えばガングリオシド $G_{M1}$ ）と共に与えられると、神経毒の存在で比色応答が検出された。この例では、シアル酸およびラクトースから誘導される脂質は「ドーパント」であり、ガングリオシド $G_{M1}$ はリガンドである。

広範な様々なドーパント物質が、本発明の様々な実施形態で使われる生体高分子材料の物性の最適化に用途を見出すことが意図される。天然の細胞膜構造の構成物である物質は、一般的に本発明のドーパントとして有用である。例えば、ステロイド（例えば、コレステロール）は、所望の不安定度もしくは安定度を生体高分子材料にあたえることができる潜在的ドーパントである。界面活性タイプの化合物も、ポリマー主鎖を作り上げる自己集合性モノマーに重合していてもいなくても、ドーパントとして役割を果たすことができる。例えば、重合可能基を含有しない洗剤TWEEN 20は、本発明のある特定の実施形態のリポソームの青色に非常に強い強度をあたえることが示されている。ドーパントとして使うことができる他の界面活性剤は、ペプチド洗剤（すなわち、膜タンパク質の膜橋架け (*membrane spanning*) 領域を模擬する疎水領域を有する小さい両親媒性分子）である。これらの小さいペプチド（典型的には長さで20~25アミノ酸）は生体高分子材料中に結合して材料の比色応答の安定性もしくは感度を変えることができる。ペプチド洗剤は材料の疎水領域で嵩が大きいので、多くの他の界面活性剤分子より薄膜安定性もしくは感度に強い影響をあたえることができる。

生体高分子材料の構造に結合されるドーパントの最も適当な百分率は、開発される特定の系および試験条件の必要性に依存する。例えば、感度は貯蔵寿命が長

い利点もしくは厳しい屋外条件に適応するために、ある程度妥協することができる。ドーパントの許容しうる百分率は、理論的には、指標のポリジアセチレン分子が必要な吸光度および色の変化を生じるに十分な結合を導入しない百分率、またはポリマー構造の安定性を破壊する百分率にのみ限定される。

ドーパントのモル百分率は、ある特定の実施様態で感度増加が観察されている0.01%の低い値からそれを越えると生体高分子材料の構造完全性が典型的に変質を始める75%の高い値まで変化しうる。しかし、ドーパントの百分率が75%より大きくまたは0.01%より低い特定の実施様態がありうる。ドーパントの好ましい範囲は2%~10%である。本発明のある特定の実施様態では、ドーパントの最適な百分率はほぼ5%（実施例4、第II節を参照）である。例えば、コレラ毒素の検出において、ラクトース誘導体化ポリジアセチレン（PDA）2%、ガングリオシド5%、およびPDA93%を含んでなる薄膜は、薄膜をアナライトとともにインキュベーションすると強い青から赤への色変化を生じた。

ドーパントの適切な結合法を選択する際に、複数の競合する考慮すべき課題がある。例えば、ある特定のリポソーム実施様態作製のための音波浴（sonication bath）法では、結合は非常に制御され、数時間の処理が必要である。この相対的に遅い、穏やかな結合法は、比較的大きいもしくは複雑なドーパント物質の結合を可能とする。しかし、音波浴手法は相対的に低い百分率のドーパントを結合することを意図するときのみ適切である。ポイントプローブ（point probe）法は、典型的には1~10分のもっと短い時間に遥かに高い百分率のドーパント物質の結合を可能とする。しかし、この方法は典型的には小さいし中間サイズのドーパント物質の結合に限定される。結合のために選ばれる温度は、特定の分析システムおよび所望のリポソームパラメーターに基づいて選定される。熟練者はpHのようなパラメーター、希釈剤の選択、および他の因子を、特定のシステムと生体高分子材料の所望の特性に基づいて選定することができるであろう。

広範囲の物理的特性をもつ一連の誘導体化ポリジアセチレンのドーパント分子を合成した。これらのドーパントは、生物学的膜（すなわちコレステロール、タンパク質、脂質、洗剤）で典型的に観察される充填物分子と同じではない。これらは所与のセンサーシステムにユニークで特異的な機能を提供する点が異なる。

非合成実施形態に特異的な機能を提供する複数のドーパントの設計を、以下および実施例4に記載する。

PDA分子を容易に誘導体化できるように、簡単なシステムを設計した。この合成を図9に示す。ここで、10,12-ペンタコサジイン酸は遊離アミノ基をもつ分子とのアミン結合体に修正される。全てのアミノ酸は遊離アミノ基（リシンは2個のアミノ基をもつ）を有するので、20個のアミノ酸をそれぞれPDA分子のヘッドに配置した。誘導体化PDA分子はそれぞれ特殊な物性を有し、生体高分子材料に特殊な機能を結合することが可能である。例えば、グルタミン-PDAをドーピングした物質は、最も感度が高く、最も水溶性があり、そして最も安定した比色センサーであった。他のアミノ酸誘導体化PDA分子の物性のいくつかを実施例4に記載する。代表的なアミノ酸誘導体化ジアセチレンに対する水溶性、薄膜およびリポソームを形成する能力、色、ならびに比色応答を図10に示す。

#### IV リガンド

本発明の生体高分子材料は、さらに1つ以上のリガンドを含んでなることができる。リガンドは、アナライトに対する生体高分子材料の認識部位として、または分子をとりこむかもしくは生体高分子表面に反応を局在化させるためのアンカーとして作用することができる。ある実施形態では、アナライトと1つ以上のリガンドとの間の相互作用により、生体高分子材料のポリマー主鎖の破壊が起こり、検出可能な色転移を生じる。脂質開裂反応の検出のために、このような比色変化を通して特定の開裂手段物 (cleavage means) (すなわちアナライト) の存在を確認することが望ましい。ある実施形態では、開裂手段物に対するリガンド（例えば、特定のリパーゼに対する抗体）を含んでなる生体高分子材料を、1つのデバイス内で、開裂手段物反応自身を検出する生体高分子材料の次に配置することができる（以下に記載した）。この方式では、開裂手段物の存在および活性の両方が単一デバイスで検出される。

リガンドは、連結アームにより自己集合性モノマーに連結させるか、直接モノマーに連結させるか、重合プロセス前もしくは重合プロセス中に生体高分子のマトリックスに結合させるか、または重合後に（例えば、リガンドをリガンドに結

合するヘッド基を含有するマトリックス構成要素に連結するかまたは他の手段を経て) マトリックスに付着させることができる。例えば、図11は本発明の1つの実施様態を模式図により描いたものである。化合物1は、スペーサー分子の1つの末端に付着した、受容体と結合するリガンド(すなわちシアル酸)を示す。スペーサー分子の他の末端は、色検出エレメントを形成するように重合された複数のモノマー(例えば、10,12-ペンタコサジイン酸)の1つに付着している。化合物2は、付着リガンドのない10,12-ペンタコサジイン酸を示す。

本発明のリガンド基は広範囲の物質を含んでなることができる。主な判定基準は、リガンドが選んだアナライトに親和性を有するかである。適切なリガンドは、限定されるものでないが、ペプチド、炭水化物、核酸、ビオチン、薬物、発色団、抗原、キレート化合物、短鎖ペプチド、ペプスタチン、ディールスアルダー(Diels-Alder) 試薬、分子認識複合体、イオン基、重合性基、ジニトロフェノール基、リンカー基、電子供与体もしくは受容基、疎水基、親水基、抗体、または受容体と結合する有機分子を含む。生体高分子材料は、所望の比色応答を最適化するために、リガンドに連結したまたは連結していないモノマーの組合わせからなることができる(例えば、5%リガンド連結ジコサジノン酸(DCDA) および95% DCDA)。さらに、多重リガンドが単一の生体高分子マトリックスに結合することができる。本発明で使うことができる広範囲のリガンドから明らかなように、非常に様々な群のアナライトを検出することができる。

ある実施様態では、自己集合性モノマーをリガンドと結合させず、直接集合させ、重合し、そして比色センサーとして使用する。このような生体高分子材料は、限定されるものでないが、揮発性有機化合物(VOC)を含むある特定のクラスのアナライトの検出に用途を見出すことができる。

ある実施様態では、様々な病原体を検出するためにリガンドを結合させて、限定されるものでないが、HIV(Wiesら, Nature 333:426[1988])、インフルエンザ(Whiteら, Cell 56:725[1989])、クラミジア(Chlamydia) (Infect. Imm. 57:2378[1989])、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、ストレプトコッカス スイス(Streptococcus suis)、サルモネラ(Salmonella)、おたふく風邪(mumps)、ニューカッスル病(newcastle)、ならびにレオウイルス(reovirus)、センダイウ

イルス (Sendai virus) およびミクソウイルス (myxovirus) を含む様々なウイルスを検出するためのシアル酸；コロナウイルス (coronavirus)、脳脊髄炎 (encephalomyelitis) ウイルス、およびロタウイルス (rotavirus) を検出するための9-OACシアル酸；シトメガロウイルス (cytomegalovirus) (Virology 176:337[1990]) および麻疹ウイルス (Virology 172:386[1989]) を検出するための非シアル酸糖タンパク質；HIVを検出するためのCD4(Khatzmanら, Nature 312:763[1985])、血管作動性腸管ペプチド(Sacerdoteら, J. of Neuroscience Research 18:102[1987])、およびペプチドT(Ruffら, FEBS Letters 211:17[1987])；ワクシニアを検出するための上皮細胞増殖因子(Epsteinら, Nature 318:663[1985])；狂犬病を検出するためのアセチルコリン受容体(Lentzら, Science 215:182[1982])；エプスタインバーウイルス (Epstein-Barr virus) を検出するためのCd3補受容体(Carelら, J. Biol. Chem, 265:12293[1990])；レオウイルスを検出するための $\beta$ アドレナリン作動性受容体(Coら, Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1494[1985])；リノウイルス (rhinovirus) を検出するためのICAM-1(Marlinら, Nature 344:70[1990])、N-CAM、およびミエリン結合糖タンパク質MAB(Shepheryら, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7743[1988])；ポリオウイルス (polio virus) を検出するためのポリオウイルス受容体(Mendelsohnら, Cell 56:855[1989])；ヘルペスウイルス (herpes virus) を検出するための繊維芽細胞増殖因子(Kanerら, Science 248:1410[1990])；大腸菌 (*Escherichia coli*) を検出するためのオリゴマンノース；髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を検出するためのガングリオシド $G_{M1}$ ；ならびに広範囲の様々な病原体 (例えば、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、ビブリオ・バルニフィカス (*V. vulnificus*)、腸炎ビブリオ菌 (*V. parahaemolyticus*)、コレラ菌 (*V. cholerae*)、およびビブリオ・アルギノリチカス (*V. alginolyticus*)) を検出するための抗体を含む。

当業者であれば、広範囲の様々なリガンドタイプを本発明の生体高分子材料と結び付けることは可能であろう。多様な範囲の化合物 (例えば、炭水化物、タンパク質、核酸、および他の化学基) で脂質を誘導体化する方法は当業では周知である。脂質の末端のカルボン酸は容易に修正して、エステル、磷酸エステル、アミノ基、アンモニウム、ヒドラジン、ポリエチレンオキシド、アミド、および

多くの他の化合物を作ることができる。これらの化学基は、炭水化物、タンパク質、核酸、および他の化学基との結合基をあたえる(例えば、カルボン酸は、活性化エステルを作り、続いてタンパク質の遊離アミノ基と反応させてアミド基を形成させることにより、直接タンパク質に連結することができる)。ラングミュア (Langmuir) 薄膜に付着させた抗体の例は当業では周知である (Troninら, Langmuir 11:385[1995]; および Vikholmら, Langmuir 12:3276[1996]を参照)。物質を膜にカップリングさせるかまたは物質を膜内に結合させる数多くの他の手法があり、とりわけ、タンパク質又は核酸のポリマー膜へのカップリング(例えば、Bamfordら, Adv.Mat.6:550[1994]を参照); タンパク質の自己集合性有機単分子層へのカップリング(例えば、Willnerら, Adv.Mat.5.912[1993]を参照) およびタンパク質の膜内への結合(例えば、Downerら, Biosensor and Bioelect.7.429[1992])を含む。リガンド(例えば、タンパク質、核酸、および炭水化物)を本発明の比色物質に付着させるためのプロトコルは実施例5で実証される。

例えば、本発明の方法は、抗体を含むタンパク質分子をポリジアセチレンの薄膜表面およびリポソームに容易に付着させるシステムを提供し、それによって、「タンパク質」リガンドをもつ生体高分子材料を提供する。このようなりガンドは、限定されるものでないが、ペプチド、タンパク質、リポタンパク質、糖タンパク質、酵素、受容体、チャネル、および抗体を含む。アナライト(例えば、酵素基質、受容体リガンド、抗原、および他のタンパク質)を結合すると、生体高分子材料のポリマー主鎖の破壊が起こり、検出可能な色の変化をもたらす。本発明は、生体高分子材料に結合したタンパク質リガンドと、生体高分子材料の表面と化学的に結合した(例えば、生体高分子材料のモノマーの表面ヘッド基に化学的に連結した)それらとを意図する。

#### V. 比色変化の検出

生体高分子材料の破壊から生じる比色変化は多くの方法により検出することができる。本請求の発明の好ましい実施形態では、色シフトは可視観察により簡単に観察された。したがって、本発明は家庭使用者のような未訓練の観察者が容易に使うことができる。



代わりの実施様態では、特定の照明光波長に対する光学密度を含む、簡単な可視観察の限界を超える質の分光変化を検出するために、当業界で周知の分光試験装置が用いられる。例えば、分光計を使って物質のスペクトルをアナライト導入前および後に測定して、比色応答 (%CR) が測定された。アナライト曝露前の材料の可視吸収スペクトルは、 $B_0 = I_x / (I_y + I_x)$  (式中、「B」は、参照波長  $I_y$  と比較した、波長  $I_x$  の所与の色相の百分率を表す) として測定された。その後、アナライト曝露後にスペクトルをとり、同様の計算を行って  $B_{final}$  を決定した。比色応答は、 $\%CR = [(B_0 - B_{final}) / B_0] \times 100\%$  として計算した。

さらに、本請求の発明は、もし所望であれば、トランスデューサーデバイスに付けることができる。自己集合性モノマー材料のトランスデューサーとの結合は、光ファイバー (例えば、Beswick and Pitt, J. Colloid Interface Sci. 124: 146[1988]; および Zhao and Reichert, Langmuir 8:2785[1992])、石英振動子 (Furuki and Pu, Thin Solid Films 210:471[1992]; および Kepley ら, Anal. Chem. 64:3191[1992])、および電極表面 (Miyasaka ら, Chem. Lett., p.627[1990]; および Bilewicz and Majd, Langmuir 7:2794[1991]) を使って記載されている。しかし、これらの例とは異なり、本発明は、材料の色変化観察によるダブルチェック (すなわち確認法) を提供する。

ある実施様態では、本発明の生体高分子材料は、共鳴振動数で振動する薄い PzT 材料上にコーティングして、マイクロエレクトロメカニカルシステム (microelectromechanical system (MEMS system)) を作ることができる。このようにして、生体高分子材料の変化を共鳴振動数の変化とともに比色変化として検出することができ、事象の確認をすることができる。

感度は、脂質ポリマーを、2つ以上の特定波長で読みとることができる光電デバイス、比色計、またはファイバー光チップにカップリングすることによって増強することもできる。また、デバイスを音響アラームまたは振動のような交流シグナル発生デバイスに連結して、シグナルを簡単に解釈できるようにすることもできる。

上記のとおり、アナライトの活性 (例えば、リパーゼの脂質開裂活性およびトランスフェラーゼの膜修飾活性) の検出に加えて、アナライトの存在を検出する

ことも望まれる。本請求の発明の生体高分子材料は、アナライト結合時に起こる色変化の観察により、限定されるものでないが小分子、微生物、膜受容体、膜断片、揮発性有機化合物(VOC)、酵素、薬物、抗体、および他の関係物質を含む様々なアナライトを検出するために使うことができる。本請求の発明は、非常に穏和な試験条件下で実施し小さい生物分子を天然に近い状態で検出する能力を提供しかつアナライトの改変もしくは分解に関連するリスクを回避する。

#### VI. 膜コンホメーション変化の検出

上記のとおり、本請求の発明は、比色変化の観察によって生体高分子材料におけるコンホメーションの変化を検出する方法を提供する。このようなコンホメーションの変化は、(上記のように)アナライトのリガンドとの結合により、および、化学反応(例えば、酵素触媒)による生体高分子材料の化学的修正を通して、起こり得る。

ある実施形態では、本請求の発明は、生体高分子材料を使う簡単なプロトコルを提供し、界面触媒を検出し、阻害剤を同定し、そして酵素および他の触媒物質(触媒抗体)をスクリーニングしてその触媒能力を特性決定する実用的手法を提供する。これらの方法は天然の無標識基質を使い、そして触媒または阻害は、周囲の脂質ポリマー集合体の色転移の有無により信号化される。この技術はワンステップであるので、化合物の高いスループットスクリーニングに便利に使用することができる。この方法は、酵素認識および活性に影響をあたえるおよび膜再編成に影響する因子に一般的に応用可能である。

重合した混合小胞(mixed vesicle)は、化学的および物理的分解に対して非常に安定であり、放射性標識した基質を用いる酵素アッセイに代わる便利で経済的な代替手段を提供する。本発明により記載された小胞ストック溶液は、6ヶ月以上アッセイ結果に影響をあたえることなく貯蔵された。

本請求の発明の特定の応用を以下に記載し、ある範囲のコンホメーションの変化に対する本発明の広範な利用可能性を説明し、その特異性、および使用の容易さを実証する。ホスホリパーゼA<sub>2</sub>、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼD、ブンガロトキシン、および他の酵素活性を説明する。これらの具体例は、単に本発明

の広範な利用可能性を説明することを意図し、本発明がこれらの特定の実施形態に限定されることを意図するものでない。

#### I. ホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性

PLA<sub>2</sub>活性は、既に、重合小胞(Duaら, J. Biol. Chem. 270, 263 [1995])、ミセル(Reynoldsら, 前掲)、および単層(Graingerら, 前掲; およびMirskyら, Thin Solid Films 284, 939 [1996])のような様々なモデル膜システムについて、標識技術(例えば、放射能および蛍光)を使って研究されている。本請求の発明は、PLA<sub>2</sub>酵素活性の比色検出のためのPLA<sub>2</sub>基質脂質を組み込む生体高分子材料を提供する。

生体高分子材料は、重合性マトリックス脂質(例えば、10,12-トリコサジン酸)と様々なモル分率(0~40%)のPLA<sub>2</sub>基質脂質(例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン[DMPC])の組合わせで、実施例1および10に記載の通り調製した。ある実施形態では、PLA<sub>2</sub>基質脂質を含有する生体高分子材料は図12に示すリポソームであった。この図は、重合前(上図)および重合後(下図)のジアセチレン脂質マトリックス中のDMPC基質を示す。その最初の状態では、小胞は肉眼には深青色に見え、図13(実線)に示すように、620nm付近に極大吸収がみられた。PLA<sub>2</sub>をDMPC/PDA小胞に添加すると、懸濁液は急速に赤色に変化し(すなわち数分内)、図13(断続線)に示すように、ほぼ540nmに極大吸収を示した。

色変化は、図14に示したように、PDA小胞中の天然脂質DMPCのモル百分率を変えることにより調節された。10%以上の相対的な色変化は肉眼ではっきりと観察された。20%以上のDMPCを含有するリポソームは、数分内に強い比色応答を示した。低モル比のDMPC(例えば、5%)を含むリポソームも、さらに長いインキュベーションの後に可視的に検出可能な比色応答を示した。DMPCを含有しない小胞は、対照サンプルに示されるように、PLA<sub>2</sub>添加後、ほとんどその青色相のまま残った。

PDA小胞およびフィルムのバイオクロミック転移(biochromic transition)はコンジュゲートポリマー主鎖の伸長した $\pi$ 重複の揺れ(perturbation)から起こ

ると提案されている。先の研究で多価受容体結合またはペプチドドメインのPDAマトリックス中への貫入により誘起されるこの構造転位は、より短波長(すなわ

ち490~540nm)の吸収を生じさせる(Charychら, Chemistry and Biology, 前掲; Pan and Charych, 前掲; およびCheng and Stevens, Advance Materials, 前掲)。酵素PLA<sub>2</sub>および混合DMPC/PDA小胞の間の相互作用により観察される強い色変化は、本事例では、界面触媒による小胞の化学的修正がバイオクロミック転移を誘起するための代わりの経路を提供することを示す。したがって、本請求の発明は生体高分子材料における比色変化を誘起する新しい手段を実証する。

生物触媒がDMPC/PDA小胞で起こったことを確認する目的で、PDAマトリックス中に組み込まれた標識脂質類似体を使いPLA<sub>2</sub>活性を独立して測定して、産物形成および小胞の比色応答の同時測定をできるようにした。使用した類似体はチオエステル1,2-ビス-(S-デカノイル)-1,2-ジチオ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DTPC)であった。PLA<sub>2</sub>によるDTPCの開裂により、すぐ5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸 (DTNB)と反応する可溶性チオール修飾脂質を生成して、特徴的に412nmに吸収のある着色産物を生成した(Reynoldsら, 前掲)。実際に、PLA<sub>2</sub>を40% DTPC/PDA混合小胞に加えると、加水分解産物はDTNBと反応して図15に示すように412nmに強い吸収を生じた。同時に、PDA小胞は色も変色し、懸濁液は図13に示したDMPCを含有する小胞のそれと同様な比色応答を示した。これらの結果はPLA<sub>2</sub>による界面触媒が重合混合小胞で起こることを確証した。

NMR実験は、さらに、PLA<sub>2</sub>による界面触媒の生起を実証し、酵素反応産物の挙動の情報をあたえた。図16は、PLA<sub>2</sub>添加前(図16A)および酵素反応後(図16B)のDMPC/PDA小胞の<sup>31</sup>P NMRスペクトルの特徴を示す。無傷の小胞からの比較的に広い異方性<sup>31</sup>P共鳴(図16A)は、PDA小胞に埋め込まれたDMPCのコリンヘッド基に対応する。図16Aの<sup>31</sup>P異方性の観察は、DMPC分子が小胞マトリックス内に固定されていることを示す。PLA<sub>2</sub>添加後、<sup>31</sup>Pシグナルは、図16Bに示されるように下方域にシフトした。図16Bの<sup>31</sup>P共鳴の位置は、DMPCの加水分解産物である水可溶性リゾミリスチルホスファチジルコリンについて観察されるシフトと一致する。さらに、図16Bは、酵素処理した小胞の懸濁液中

で観察された<sup>31</sup>P共鳴が、最初のDMPC/PDA小胞由来の<sup>31</sup>Pシグナルより著しく狭くなることを示し、そして図16Aは、PLA<sub>2</sub>触媒後、リン酸基のより高い移動性を示す(

Smith and Ekiel, Phosphorous-31 NMR, Principles and Applications, Academic Press, Orlando, pp 447 [1984]). この結果は、酵素反応後のリゾ脂質反応産物の解離を示唆する。PLA<sub>2</sub>との反応後の明確なリゾ脂質相の出現を示す<sup>1</sup>H NMRデータは、さらにこの記述を支持した。

## II. 他のホスホリパーゼ

ホスホリパーゼC (PLC) およびホスホリパーゼD (PLD) のような他の酵素による界面触媒の比色検出も基質修飾したPDA小胞を使って達成され、本発明により記載した手法が一般的に応用できることを実証した。これらのホスホリパーゼは、グリセロリン脂質の極性ヘッド基領域を開裂するが、ホスホリパーゼPLA<sub>2</sub>はアシルエステル結合を専ら2-アシル位置で開裂する。

ホスホリパーゼDおよびCのアッセイ試験を、PLA<sub>2</sub>アッセイと同様の条件下で実施した。PLDおよびPLC活性は共に、リポソームアッセイにより成功裏に検出された。PLDアッセイはほぼ55%の最終比色応答を生じた。しかし、応答曲線の形状はPLA<sub>2</sub>のそれより緩やかであった。本発明を使用するためにその機構を理解することは必要でなく、そして本発明がそれによって限定されることを意図しないが、PLD触媒反応の動力学が異なるか、または触媒事象と色変化の間の応答時間はより遅いことが意図される。PLCアッセイは60%の最終比色応答を生じ、応答曲線はPLA<sub>2</sub>のそれと同様であった。さらに、NMR実験はPLCおよびPLDによる界面触媒の存在を実証した。

## III. ブンガロトキシン (BUTX)

毒蛇ブンガルス・ムルチシンクツス (*Bungarus multicinctus*) 由来の蛇毒であるβ-ブンガロトキシンは、シナプス小胞を破壊してアセチルコリン放出を阻害することで知られる。これはPLA<sub>2</sub>毒素として分類され、2つのサブユニット：PLA<sub>2</sub>活性を現す12-kDaサブユニットおよびプロテアーゼ阻害剤と配列相同性を共有する7.5-kDaサブユニットから構成される。

ブンガロトキシンと40% DMPC/60% 10,12-トリコサジン酸 (TRCDA) リポソームによる実験は、1時間のインキュベーション後にほぼ50%の最大比色応答を示した。応答曲線はPLA<sub>2</sub>アッセイのそれと同様であった。さらに、BUTXでインキュ

バージョン後、アッセイ溶液中のリポソームは色に変化したのみでなく沈殿も生じた。先の研究では、BUTXは小さい単層リポソームの融合を誘導することが示されていた(Rufiniら, *Biochemistry* 29,9644[1990])。融合の機構は不明確なままであるが、BUTX、 $\text{Ca}^{2+}$ 、およびリゾリン脂質の間の相互作用に依存するようである。

このブンガロトキシシンアッセイは、生体高分子材料の比色変化を生成する能力のある酵素特性を持つ大きな分子集合物 (molecular assembly) の一例を提供する。ある実施形態では、比色検出を増強するために追加のブンガロトキシシン検出特性を生体高分子材料に加えることが望まれるであろう。例えば、ブンガロトキシシンに対する抗体 (すなわち、リガンド) をDMPCに追加して、生体高分子材料に組み込むことができる。このようにして、ブンガロトキシシンが或るサンプル中に存在する場合、リガンド/アナライト相互作用と酵素/基質反応が組み合わさって比色応答の増強を提供する。

#### IV. 他の酵素系

本発明は、限定されるものでないが、とりわけ脂肪分解酵素、アシルトランスフェラーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、ポリメラーゼ、およびプロテイナーゼを含む多くの他の系の酵素活性の検出、測定、および特性決定に用途を見出すであろう。このような酵素は溶液中で遊離しているか、または大きな分子凝集体、細胞、および病原体の一部でありうる。生体触媒事象の一般的記述については、ドルディックの著書(Dordick, *Biocatalysts for Industry*, Plenum Press[1991])を紹介する。

例えばグリコシダーゼを、その活性を測定するためまたは病原体の存在の指標として検出することができる。ノイラミニダーゼのようなシアリダーゼはインフルエンザウイルスに見出され、他のシアリダーゼはサルモネラ (*Salmonella*) と関連している。グリコシダーゼ用の基質をもつ生体高分子材料を提供することに

より、病原体の存在を検出することができる。他の検出エレメント (例えば、インフルエンザウイルス検出用のシアリ酸リガンド) と組み合わせて、非常に感度の高い比色センサーを作製することができる。

プロテイナーゼ用の検出系を作る基質も提供することができる。例えば、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) は、ペプスタチン基質に対するプロテアーゼ活性を通して検出することができる。炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 由来の炭疽孢子 (anthrax spores) も、基質との反応を通してラッカーゼ活性を確認することにより検出することができる。ラッカーゼは、フェノール、ポリフェノール、および芳香族アミンを含む様々な基質の酸化転化の触媒作用をする複数の銅を含有する酵素である。特異的な基質は、バニル酸 (vanillic acid)、シリンジ酸 (syringic acid)、および2-2'-アジノ-ビス(3-エチル-ベンズチオアゾリン-6-スルホン酸)を含む。1つ以上のこれら周知のラッカーゼ基質を本発明の生体高分子材料に導入することにより、炭疽孢子用の検出アッセイを作製することができる。

他の応用は、ヌクレオチドポリメラーゼ (例えばDNAポリメラーゼ) 活性を試験するための生体高分子材料上への核酸の組込みを含む。これらのアッセイ系は、ポリメラーゼ阻害剤の同定および特性決定の技術に用途を見出すであろう。これらの例から、本発明の生体高分子材料が、広範囲の膜コンホメーション変化および反応の比色検出に用途を見出すことは明白である。

#### V. 阻害剤スクリーニング

上に記載したとおり、本請求の発明は、生体高分子膜のコンホメーションを変える酵素および他の分子の活性を検出するための方法を提供する。これらの方法は、比色変化に関わる活性をもつ阻害剤を同定しかつ特性決定するための正確で迅速なスクリーニング技術を提供することに拡張することができる (例えば、候補阻害剤を酵素のタンパク質基質を含んでなる生体高分子材料に曝すことによりプロテアーゼ阻害剤を同定し特性決定する)。

例えば、上に記載したPLA<sub>2</sub>酵素活性の検出では、DMPC/PDA小胞の色変化はPLA<sub>2</sub>への阻害剤を使うことにより抑制することができる。1-ヘキサデシル-3-トリフルオロエチルグリセロ-2-ホスホメタノール (MJ33) (Geら, 前掲; および

Jainら, *Biochemistry* 30,10256[1991])の存在で、PLA<sub>2</sub>を添加すると小胞はそれらの青い相のまま残った。この色の差は、96ウェルマイクロタイタープレート中

のMJ33存在（青色）および不在（赤色）の $\text{PLA}_2$ ／小胞懸濁液において明らかに可視化された。ウエルの吸収を標準マイクロプレートリーダーを使い測定し、図17に示すように、定量的に比色応答の抑制を確証した。この図は、阻害剤の不在における（実線、最大誤差1.9%）およびMJ33の存在における（断続線、四角、最大誤差6.9%）DMPC/PDA小胞に対する比色応答曲線を示す。 $\text{Ca}^{+2}$ を $\text{Zn}^{+2}$ に置き換えることによる $\text{PLA}_2$ の阻害も示す（断続線、菱形、最大誤差6.5%）。

青から赤への変化のMJ33による阻害は、非特異的付着はバイオクロミック応答に役割を果たさず、 $\text{PLA}_2$ 活性が直接色変化に関わることを示す。 $\text{PLA}_2$ の不活化は、バッファー溶液からの $\text{PLA}_2$ の触媒補因子（Gelbら, 前掲）である $\text{Ca}^{+2}$ の除去でも観察される。同様に、 $\text{Ca}^{+2}$ イオンの代わりに $\text{Zn}^{+2}$ を含有するバッファー中に調製された $\text{PLA}_2$ は、図17（断続線、菱形）に示されるように小胞の青から赤への変化を誘起しない。この小胞は、40%DMPC/PDA小胞で1時間以上インキュベーション後に共に5%未満の比色応答を得るリゾチームおよびグルコースオキシダーゼのような他の酵素の存在でも、色を変化させない。比色応答の特異性は、酵素阻害剤の高いスループットスクリーニングに必要な選択性を提供する。

阻害剤をスクリーニングするためには、試験される酵素の基質を含む生体高分子材料を多チャンバデバイス（例えば96ウェルプレート）中に配置する。各ウェルを酵素阻害剤を含有すると疑われるサンプルとともにインキュベートする。その後、酵素を加え、色変化の観察を検出する。有効な阻害剤は部分的もしくは完全に、酵素が生体高分子材料の色変化を生じるのを阻止するであろう。結果に信頼性をあたえるために、適切な対照サンプル（例えば、阻害剤無しおよび既知阻害剤を含むサンプル）をアッセイにかける。

## VI. 設計された触媒

本請求の発明の生体高分子材料は、さらに、「設計された」タンパク質、ペプチド、および触媒抗体の効果と活性をスクリーニングする方法を提供する。とりわ

け特定の溶媒および熱条件下で安定な酵素を工学的に作ることが現在盛んに行なわれている。本発明の生体高分子材料にこのような酵素に対するある基質をあた



えることにより、これらの工学的に作られたタンパク質の簡単に正確なスクリーニングを様々な試験条件で実施することができる。同様に、本発明の方法を使って、触媒抗体をスクリーニングし、特性決定することができる。

## VII. 生体高分子材料の固定

本発明の生体高分子材料は、限定されるものでないが、ポリスチレン、ポリエチレン、テフロン、シリカゲルビーズ、疎水化シリカ、マイカ、濾紙(例えば、ナイロン、セルロース、およびニトロセルロース)、ガラスビーズおよびスライド、金、ならびにシリカゲル、セファデックス (sephadex) および他のクロマトグラフィー媒質のようなあらゆる分離媒質を含む、様々な固体支持体上に固定することができる。ある実施形態では、生体高分子材料はゾルゲル法を使ってシリカガラスに固定される。

本発明の比色生体高分子材料の固定は、その安定性、堅牢性、貯蔵安定性、比色応答、色、使用の簡便さ、デバイスへの組込み(例えば、アレイ)、および他の所望の性質を改良するために望ましい。ある実施形態では、周知で使用容易なりトマス試験紙と同様な試験法を作るために、様々な基質表面上へ比色物質のを配置することができる。例えば、ナイロン濾紙の反射特性 (reflective property) は固定化ポリジアセチレンリポソームの比色特性を大いに増強する。濾紙も、メッシュサイズによってリポソームの安定性を増加する。他の例では、本発明のリポソーム実施形態は、インクジェットプリンターのインクカートリッジに装填され、生体高分子リポソーム材料をインクのごとく紙上に印刷するために使われる。紙上に存在するリポソーム物質は、その比色特性を保持する。この実施形態は、パターン化アレイを所望の形状およびサイズに作製することができる容易さを実証する。多重カートリッジ (例えば、カラープリンター) を使うことにより、パターン化アレイは様々な生体高分子材料により作製することができる。

### A. ゾルゲル法による生体高分子材料の包括

ゾルゲル法は染料および生物分子のような有機分子をシリカゲル中に包括 (entrapping) するために使うことができるが(例えば、Avnir,Accounts Chem.Res.28.328[1995];Yamanakaら,Am.Chem.Soc.117:9095[1995];Millerら,Non-Cryst.Sol

ids 202:279[1996] ; およびDaveら, Anal.Chem.66.1120A[1994]を参照)、本発明の開発前には、自己組織化分子凝集体（例えば、生体高分子材料、自己集合性モノマー凝集体、およびリポソーム）の固定化はゾルゲル材料で実現されていなかった。

本請求の発明の実施形態は、好結果が得られる水性ゾルゲル法を使う、球状、二層脂質凝集体、およびリポソームの固定化を提供する。これらの分子構造体、特に生物学的もしくは生物模倣（すなわち天然を模擬する）脂質からなるリポソームは、水溶液条件下かつ常温でかなり堅牢であるが、有機溶媒の存在かつ高温では容易に分解しうる。ゾルゲル法は、検出されるような構造改変がなく分子凝集体を固定化する容易な方法を提供し、所望のサイズもしくは形状に容易に加工される堅牢な構造物を作製する。

テトラメチルオルトシリケート、水、および塩酸を単相溶液が得られるまで冷却条件下で音波処理して、シリカのゾルゲル材料を調製した。テトラメチルオルトシリケートの他に、金属酸化物の使用が、それらが包括を容易にしかつ実質的に透明なガラス材料を形成する限りにおいて、本発明により意図される。このような金属酸化物は、限定されるものでないが、珪酸塩、チタン酸塩、アルミン酸塩、オルモシル(ormosils)、その他を含む。その後、バッファをその酸性溶液に冷却条件下で加えた。上に記載のとおり作製された生体高分子材料を、このバッファゾル溶液に混合した。この複合物を所望の成形構造体に注ぎ入れて、常温でゲル化させた。限定されるものでないが、キュベット、薄いフィルムを作るための平坦な表面、プラスチック、セラミック、もしくはバッジを作る金型などを含む所望のサイズと形状のゲルを作製するために様々な構造物が応用されうると考えられるので、本発明は使用する成形構造体により限定されることを意図していない。機能性アナライト検出ゲルの製造を容易にする全ての温度範囲を意図しているので、本発明は常温のゲル化に限定されることを意図していない。

1つの実施形態では、DCDAリポソームをゾルゲルガラスに組み込んだが、本発明ではいずれの生体高分子構造物の組み込みも意図する。上に記載したゾルゲル過程の後、数分内にゲル化が起こって紫色のゲルを生成した。図18に示されるポリ

ジアセチレンリポソームの可視吸収スペクトルは、溶液中のリポソームと比較して、ゾルゲルマトリックス中で変化はなかった。リポソームを55℃に加熱した後、ポリジアセチレン材料の特徴である青から赤へのサーモクロミック転移が起こった。図19のスペクトルに示されるように、青から赤へ色相変化した物質は、溶液と比較して、同じ様にゾルゲル状態で変化はなかった。したがって、本請求の発明は、脆弱な生体高分子材料構造物（すなわちリポソーム）と相容して、バルク溶液中で観察される物性を維持するゾルゲルマトリックスを提供する。

さらに、様々な厚みのゾルゲル調製材料はアナライトに対してユニークな感度を持つことが意図される。厚いフィルムであるほど（表面）対（体積）比が高いため、色転移のきっかけを作るためにより高濃度のアナライトが必要となる。

さらに、所望の孔サイズをもつ材料を作るために、ゾルゲル調製のゲル化条件は、ゲル化温度、ゲル材料、および乾燥条件を変えることにより最適化することができる。材料の架橋密度を変えることによって、孔サイズを制御することができる。本発明により、数ナノメートルから数百ナノメートル以上の孔サイズが意図される。あるゲルは、アナライトのリガンドへのアクセスを維持する一方、所望でない物質のサイズ選択的なスクリーニングを可能とする。また、ゾルゲル技術により、限定されるものでないが、カートリッジ、コーティング、モノリス (monolith)、粉末、および繊維を含む所望のどの形状でも成形されうる構造物を形成することが可能になる。

## B. 化学結合による固定

本発明のある実施形態では、生体高分子材料は、ポリ（エーテルウレタン）またはポリアクリロニトリルの膜に結合させることができる。これらの膜は多孔質かつ親水性であり、アフィニティー分離または免疫診断に使うことができる。本発明のリポソームをこれらの膜とカップリングさせるのは、先ずイミジゾリルカルボニル、スクシンイミド、FMPまたはイソシアネートのような活性化基を膜

に結合させ、膜がリポソーム中に存在する求核基（例えば、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、もしくは $-OH$ 基）に速やかに付加することによって行うことができる。このようにして、これらの官能基を含有するリポソームの調製物も、直接、膜に結合させる

ことができる。この手法は、当業界で周知のタンパク質の膜へのカップリングと類似している(例えば、Bamfordら, *Chromatography* 606:19[1992]を参照)。

当業界で周知の様々な他の固定化技術を本発明の生体高分子材料に使用することができる。例えば、-SH官能基を有する物質も、直接、金表面、粒子、または電極にチオール金結合を経て固定することができる。この場合、-SH基を含有するリポソームの溶液は、清浄な金表面と共に水中で、12~24時間、室温で攪拌してインキュベーションする。また、物質をシリコンチップもしくはシリカゲル(例えば二酸化ケイ素)に、実施例8に記載の方法を使って固定することもできる。さらに、-NH<sub>2</sub>官能基を含有する物質も、タンパク質の固定でしばしば使われる標準のグルタルアルデヒドカップリング反応によって、表面に固定することができる。さらに、リポソームは、そのカルボキシ基を経て、遊離アミン基をもつ分岐ポリマーであるポリエチレンジアミンを含む表面に結合させることができる。

#### VIII. アレイ

本請求の発明のある特定の実施形態は、単一デバイス内に、他の所望の特性および品質の中でも、選択性、感度、定量性、使用の容易さ、および携帯性を増加するために、様々なヘッド基化学、リガンド、ドーパント、モノマーもしくは他の性質をもつ重合性脂質の大きなパレットの作製を意図する。アレイフォーマットを使うことにより、単一センサー手法の欠点を克服するいくつかの利点を実現することができる。これらは、部分選択性のあるセンサーを使用し、多成分サンプルを測定する能力を含む。これは、妨害バックグラウンドの存在する中で特定サンプルを感知するか、または同時に2つ以上の目的のサンプルをモニターする能力を与える。それぞれのサンプルに特徴的な確認可能なフィンガープリントを作製する目的で、所与の脂質の所与のサンプルに対する感度を決定することができる。例えば、サンプルXの存在で、PDA誘導体Aの脂質ポリマーフィルムは、完全にオレンジ相に変換する(%CR=100)が、PDA誘導体Bは70の%CRを有し

てピンク色を生じ、PDA誘導体Cは40の%CRを有して紫色を生じ、そしてPDA誘導体Dは全く色の変化がない(すなわち、青/紫のまま)とし得る。応答フィンガープリントのオレンジ/ピンク/紫/青紫は、サンプルXの存在を示すであろう

。明らかに、アレイのエレメント数が高いほど、所与のアナライトに対するポジティブの確認の機会が高い。生体高分子材料を固定することにより、どの所望サイズおよび形状の材料でも作製して、小さく、容易に読み取れ、そして解釈可能なデバイスに結合することができる。

サンプルの存在および活性の両方を測定するアレイを作製することができる。例えば、ある特定の酵素を特性決定する場合、アレイの一部分は（例えば、酵素と相互作用するリガンドを組み込むことによって）酵素に対するアナライト検出能力を提供することができるが、他の部分（例えば、生体高分子材料内に酵素用基質を含むことにより）酵素活性アッセイを提供する。このようなアレイは、アレイの各部分が定量的もしくは定性的データを提供しまたは対照実験を提供する阻害剤スクリーニング技術における使用に拡張することができる。

#### 実験

次の実施例は、本発明のある特定の好ましい実施形態および形態を実証しかつさらに説明する目的で提供されており、本発明の範囲を限定するものとして解釈されてはならない。

以下の実験の開示において、次の略語が適用される；N(規定)；M(モル)；mM(ミリモル)； $\mu$ M(マイクロモル)；mol(モル)；mmol(ミリモル)； $\mu$ mol(マイクロモル)；nmol(ナノモル)；pmol(ピコモル)；g(グラム)；mg(ミリグラム)； $\mu$ g(マイクログラム)；ng(ナノグラム)；lまたはL(リットル)；ml(ミリリットル)； $\mu$ l(マイクロリットル)；cm(センチメートル)；mm(ミリメートル)； $\mu$ m(マイクロメートル)；nm(ナノメートル)； $\mu$ Ci(マイクロキュリー)；mN(ミリニュートン)；A(オングストローム)；kDa(キロダルトン)；ppm(100万分の1部)；N(ニュートン)； $^{\circ}$ C(度、摂氏)；wt%(重量百分率)；aq.(水性)；J(ジュール)；UV(紫外)；XPS(X線光電子分光法)；PDA(ジアセチレンモノマー)；PCA(ペンタコサジイン酸モノマー)，DCDA(ドコサジイン酸)；TRCDA(トリコサジイン酸)；SA-PDA(シアル酸誘導体化PDA)；BUTX(ブンガロトキシシン)；OTS(オクタデシルトリクロロシラン)；VOC(揮発性有機化学物質)；CR(比色応答)；pH(水素イオン濃度)；EDC(エチルカルボジイミド塩酸塩)；AFM(原子間力顕微鏡)；Hz(ヘルツ)；LB(ラングミュアープロ

ジェット (Langmuir-Blodgett)); NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド);  $\text{CO}_2$  (二酸化炭素);  $\text{MgSO}_4$  (硫酸マグネシウム);  $\text{CdCl}_2$  (塩化カドミウム); MeOH(メタノール); Be(ベリリウムイオン); Mg(マグネシウムイオン); Ca(カルシウムイオン); Ba(バリウムイオン);  $\text{N}_2$  (窒素); Sigma(シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co., St. Louis MO)); Perkin-Elmer(パーキン・エルマー社(Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT)); Fisher(フィッシャー・サイエンティフィック社(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)); および Farchan Laboratories(ファルカン・ラボラトリーズ社(Farchan Laboratories, Inc., Gainesville, FL)); Park Scientific Instrument(パークサイエンティフィックインスツルメント社(Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA)); Biorad(バイオラッド・ラボラトリーズ社(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)); Gelman(ジェルマン・サイエンス社(Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)); Pierce(ピアース社(Pierce, Rockford, Ill)); および Bellco Glass(ベルコ・グラス社(Bellco Glass Inc., Vineland, NJ))。

全ての化合物は試薬グレード純度であり、断りのない限り供給されたまま使用した。有機溶媒はフィッシャー・サイエンティフィック (Fisher Scientific) から入手した分光グレードであった。全ての水溶液は、 $18.0\text{M}\cdot\text{Ohm}\cdot\text{cm}$ 抵抗と登録された有機物除去カートリッジ (ORGANICfree cartridge) を備えたバムステッド脱イオンシステム (Bamstead Type D4700 NANOpure Analytical Deionization System) を通して精製した水を使って調製した。

#### 実施例 1

##### 生体高分子材料の調製

##### 1. リポソームの製造

リポソームに組み込まれる自己集合性モノマーを、溶媒 (例えば、ジアセチレン用にクロロホルムおよびガングリオシド $\text{G}_{41}$ 用にメタノール) に溶解した。限定されるものでないが、ベンゼン、ヘキサン、および酢酸エチルを含む多くの他

の揮発性溶媒が、本発明で使用される。溶媒溶液を、褐色のバイアル (すなわち、以後の乾燥工程中に光干渉を防止するため) 中で適切な容量で混合して所望の脂質混合物 (例えば、モルにより5%の $\text{G}_{41}$ 、95%のジアセチレン) およびほぼ2

$\mu\text{mol}$ の全脂質含量を得た。その後、溶媒を回転蒸発によるかまたは窒素気流で蒸発させた。乾燥した脂質を、1~15mMの脂質溶液を作るに十分な脱イオン水中に再懸濁した。その後、溶液を15~60分間プローブソニケーター(Fisher sonicdismembrator model 300、50%出力、マイクロチップ)で、ニュー(New,前掲)が記載したように音波処理した。溶液を音波処理中、加熱して(ほとんどの場合、音波処理のみで十分な熱があたえられる)、使用する脂質の相転移以上の温度(典型的には30~90℃)とした。生じた混合物を0.8マイクロモルのナイロンフィルター(Gelman)または5mmのミリポアフィルター(Millipore Millex-SV filter)を通して濾過し、貯蔵のため4℃に冷却するかまたは重合した。ある実施形態では、重合の前に、窒素をサンプルを通して5~10分間泡立たせて溶液中の酸素を除去した。

攪拌したリポソーム溶液の重合は、1cm石英キュベット中で、小さい254nm紫外ランプ(ペン光線、エネルギー:1600マイクロワット/cm<sup>2</sup>)を3cmの距離で照射して実施した。全ての酸素を置き換えサンプルを冷却するために、重合中、チャンバーを窒素でパージした。重合時間は5~30分の間で、リポソームの所望特性(例えば、色、重合度)に依って変えた。他の実施形態では、溶液を紫外チャンバー内にパージせずに置き、0.3~20J/cm<sup>2</sup>、好ましくは1.6J/cm<sup>2</sup>の紫外照射に5~30分の間、曝露した。

ある実施形態では、重合をマルチチャンバプレート(例えば、ELISAプレート)内で実施した。ほぼ200 $\mu\text{l}$ の音波処理したリポソーム溶液をプレートの各ウェル内に入れた。プレートを、紫外ランプ下で、プレートとランプ間の距離3cmに配置した。照射時間は典型的には1分間続けた。照射を長くすると、ピンク/紫リポソームを形成し、色変化が紫外光により開始されたことを示した。このようなりポソームは、ばらつきのある結果を与えるので、避けるべきである。

## II フィルムの製造

ポリジアセチレンフィルムは、標準のラングミュア・プロジェクト(Langmuir-Blodgett)トラフ中で作製した(例えば、Roberts, Langmuir Biodgett Films, Plenum, New York[1990]を参照)。トラフを水で満たしてフィルム用の表面を作

った。蒸留水は、ミリポア浄水器により18.2M-Ohmの抵抗率で精製した。溶媒展開剤（例えば、分光グレードクロロホルム[Fisher]）中に溶解したジアセチレンモノマー（例えば、5,7-ドコサジイン酸、10,12ペンタコサジイン酸(Farchan Laboratories)、5,7-ペンタコサジイン酸、それらの組合わせ、または他の自己集合性モノマー）を水面上にシリンジで層形成して、連続フィルムを形成した。1.0~2.5mMの濃度範囲で調製したモノマーを温度4℃で暗所に保存し、実験で使用する前に室温に平衡化した。

水面上に層が形成されると、緊密にパックされた自己集合性モノマーの単層を形成するように、可動バリヤーを使ってフィルムを物理的に圧縮した。単層を最も緊密な形態に（例えば、20~40mN/mのフィルム表面圧に達するまで）圧縮した。圧縮後、フィルムを重合した。本発明のある特定の実施形態（例えば、ドーパントを用いる具体例）は、おおよそ20~40mN/mの表面圧圧縮を必要としよう。

紫外照射を使って、モノマーを重合したが、重合の他の手段（例えば、 $\gamma$ 線照射、X線照射、および電子ビーム曝露）を使うことができる。フィルム上の圧力は、可動バリヤーで照射プロセスを通じて20~40mN/mの表面圧に維持した。

紫外ランプはフィルムおよびトラフから20cm以上離れて置いた。もしランプがもっとフィルムに近いと、フィルム加熱効果によりジアセチレンフィルムに損傷が起りうることが分かった。フィルムは、ほぼ254nmの波長の紫外光にほぼ1分間、曝露した。重合は、重合したジアセチレンの形成時に得られる青色を観察し、かつ偏光光学顕微鏡により重合ジアセチレンフィルムに典型的な線形の筋を検出することによって確認した。

### III. 管の製造

管 (tubule) に組み込むための自己集合性モノマーを、リポソームについて上に記載したように、溶媒に溶解し、一緒に混合し、蒸発し、そして水中に再懸濁した。容量で1~10%のエタノールをこの溶液に加えたが、本発明では他の有機溶媒も意図される。その後、リポソームについて上に記載したように、溶液を音波処理し(必要により加熱して)、濾過し、冷却し、そして重合した。

#### 実施例 2



## 生体高分子材料の試験

## I 光学顕微鏡検査法およびX線分光分析法

ジアセチレンフィルムを、PDAモノマーおよびシアル酸誘導体化PDAモノマーの組合せを用いて上記のようにラングミュアープロジェクトラフ(trough)で調製した。浮動重合アセンブリ(floating polymerized assembly)を、水平接触法(horizontal touch method)によって、記載されたように(MaozおよびSagiv, J. Colloid Interface Sci. 100:465[1984])、予めオクタデシルトリクロロシラン(OTS)の自己集合性単分子層(monolayer)で被覆されたガラススライド上に持ち上げた。

次いで、スライドを光学顕微鏡検査法により記載されたように(DayおよびLand o, Macromolecules 13:1478[1980])直交偏光子を用いて試験した。フィルムは、図20の光学顕微鏡写真に示されているように、巨視的範囲以上の高いオーダー(すなわち $50\sim 150\mu\text{M}$ )を示した。 $150\mu\text{M}$ 以下の大きなドメインが目に見えた( $1\text{cm}=10\mu\text{M}$ )。

フィルムを、さらに、角度分解X線光電子分光分析法(XPS)および楕円偏光法によって特性付けた。XPSの結果から、ヘッド基のアミド窒素原子およびカルボニル炭素原子が脂質鎖のメチレン炭素に比べて表面に局在化していることがわかった。これは、シアロシドヘッド基がフィルムの表面に存在することを示すものである。HF-処理シリコン上を被覆するポリジアセチレン単分子層の楕円偏光分析により約 $40\text{\AA}$ のフィルム厚が示され、これは分子モデリングに基づいた予測値と一致していた。

## II 原子間力顕微鏡検査法

in situ原子間力顕微鏡検査法を用いて微視的生体高分子結晶の形態学、表面トポグラフィー、および成長および溶解特性を明らかにし、核形成事象を動的観察し、測定した。研究は、Binnigら(Binnigら, Phys. Rev. Lett. 12:930[1986]);およびBinnigら, Europhys. Lett. 3:1281[1987])に記載されたように、in situ研究用の標準技術を用いて行った。

二つの異なる原子間力顕微鏡検査法をこの研究に用いた。 $1\mu\text{m}^2$ よりも大きな

像は市販の器具 (Park Scientific Instrument) を用いて得られた。この場合、Siウルトラレバー (ultralever) (Park Scientific Instrument) を用いた。市販の写真平版法によりパターンが焼き付けられたガラススライド (Bellco Glass) を用いることにより、各温度工程後にフィルムの正確な同一領域を画像化することができた。1  $\mu\text{m}^2$  よりも小さい象は、自作のAFM (Kolbeら, Ultramicroscopy 42-44:1113[1992]) を用いて得た。公称力定数0.1N/mの $\text{Si}_3\text{N}_4$ 片持ちばり (cantilevers) を用いた (Park Scientific Instrument)。両方の顕微鏡を接触モードで操作し、後者の場合、4クワドラント位置高感度 (four-quadrant position-sensitive) フォトダイオードにより、片持ちばりの曲げおよび捻りを同時に測定することができた。像は全て周囲条件下で接触モードで得た。

### 実施例3

#### 生体高分子材料の最適化

本発明は、ドーパント材を用いて、そしてドーパント材を用いずに、種々のリガンドを用いて、種々の形態に固定された、種々の異なる生体高分子材料形態 (例えば、リポソーム、フィルム、管など) を提供する。これらの実施形態のそれぞれについて、生体高分子材料を最適化することにより、感度、堅牢性 (robustness)、比色応答、およびその他の望ましい因子を最大にすることができる。そのような最適化を説明する幾つかの例を下記に示す。これらの例は、単に本発明の柔軟性を説明するためのものである。本発明はこれらの特定の実施形態に限定されるものではない。

#### I 混合モノマー

本発明の生体高分子材料は、純粋なモノマー (例えば純粋なジアセチレン) の試料を含み得るものであり、または混合モノマー (例えば、ガングリオシド $\text{G}_{41}$  またはドーパントを含むPDA) を含み得るものである。混合モノマーのパーセント組成の最適化を行うことにより所望の特性を有する生体高分子材料を得ることができる。そのような最適化の例を、ガングリオシドリガンドを有するアナライト (すなわち、コレラ毒素) の検出に関して下記に示す。

$\text{G}_{41}$ /PDAフィルムの比色応答を評価するために、リガンド (すなわち $\text{G}_{41}$ )

とPDAの種々の濃度の組合せを試験した。加えるリガンド分子が多すぎる（すなわち、重合脂質の濃度が低い）場合、フィルムは不安定であり、バックグラウンドが高かった。フィルムが重合脂質分子を多く含みすぎる場合、フィルムは不安定すぎて、色変化が十分に生じない。最大応答を示す能力を有する $G_{w1}$ /PDA バイオセンサー組成物の調査においては、一連のPDA単分子層フィルムをOTS被覆ガラススライドに移した。フィルムをコレラ毒素に曝すことによって評価し、比色応答をUV-可視分光分析法を用いて測定した。図21に、初期吸光度、移動率(transfer rate)、ならびに緩衝液中およびアナライトに応答した比色応答を示すこれらの実験で研究した $G_{w1}$  バイオセンシング単分子層フィルムの比色特性および応答をまとめる。初期吸光度( $A_{init}$ )は、640nmにおけるフィルムの最大ピーク値を反映するものであり、フィルムの移動速度および組成の関数である。混合アセンブリに色官能基(chromatic functionality)を付与しない $G_{w1}$ は、一般的に、初期の青色の強度を減少させる。移動率は、強靱な表面上で減少した面積と下位相(subphase)に現れた基層(substrate)の面積の割合であり、PDAフィルムはシアル酸-PDA(SA-PDA)および $G_{w1}$ 分子のものと比較した場合に移動性が高いということを示すものである。青から赤への比色応答(CR)により、単分子層フィルムが、高含量の $G_{w1}$ またはSA-PDAを使用する場合以外は緩衝液中で低CRを示すということがわかる。

## II 下位イオン相(subionic phase)の最適化

水性下位相のイオン含量は、ラングミュア単分子層の特性に有意な影響を与える。陽イオン種の存在により陰イオンヘッド基を有する単分子層の静電的相互作用

が強められ、その結果フィルムが安定化される(Gaines, Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interface, Interscience Publishers, ニューヨーク, pp291-299[1966])。図22に、5% $G_{w1}$ /5%SA-PDA/90%PDAの等温線を $CdCl_2$ の下位相濃度の関数として示す。 $Cd^{2+}$ の濃度が上昇するにつれて膨張相(expanded phase)は系統的に低分子領域方向へシフトし、これは、単分子層が高濃度の $Cd^{2+}$ で安定化されるということを示すものである。この挙動は、 $Cd^{2+}$ とPDAの部分的に解離した陰イオン性カルボキシレートヘッド基( $pK_a \approx 5$ )のイオン相

相互作用に因るところが大きい。一方、酸性S A - P D A および $G_{41}$  (これらの分子のシアル酸について $pK_a \approx 2.6$ ) も恐らくその作用を強めるのに貢献する。単分子層安定化のかかる機構についてのさらなる証拠は、高イオン濃度の関数としての表面圧の増大において見られる。多くの2価イオン (Be、Mg、Ca、Ba、およびCd) は、塩生成によってP D A モノマーの等温線に影響を与えることが示されており、この塩生成はイオンの大きさおよび電荷を基礎とした分子のパッキングに影響を及ぼす。0.01M以下の $Cd^{2+}$ を含む水性下位相における5% $G_{41}$ /5%S A - P D A/90%P D Aの三成分系に対して不混和性の傾向は観察されなかった。これは、この混合単分子層がイオン含量に関して比較的安定であるということを示すものである。しかしながら、 $Cd^{2+}$ が0.1Mまで増大した場合、5% $G_{41}$ /5%S A - P D A/90%P D A単分子層の不安定な挙動が観察された。これは、S A - P D A中のシアル酸とP D A中の $G_{41}$ およびカルボン酸間で $Cd^{2+}$ との相互作用の能力が異なること、または高塩濃度での沈殿の結果、凝集ドメインが生成することによるものであるかもしれない。

低 $Cd^{2+}$ 濃度 (すなわち、約 $10^{-4}$ M) では、等温線は凝縮相領域内でほとんど変わらず、これは下位相中の低含量のイオンはコンパクトフィルムの構造に有意な影響を与えないということを示すものである。 $10^{-3}$ M以上に $Cd^{2+}$ の濃度が上昇すると、図22に示されているように凝縮相領域の分子領域のシフトが生じ、これはコンパクト単分子層における何らかの構造変化を示すものである。そのような構造変化の誘導に対する混合物中の添加剤の役割を調査するために、 $10^{-2}$ Mの $Cd^{2+}$ における純粋なP D Aの等温線を測定した。 $10^{-2}$ Mの $Cd^{2+}$ 下位相では、低分子領域において急激な上昇がP D Aの等温線において観察される。しかしなが

ら、コンパクト領域および分子領域内の等温線の勾配は、本質的に水の場合と同じであった。そのような結果は、高塩濃度における規則正しいフィルムと一致しており、このフィルム特性は、主に分子の長い疎水性部分によって規定される。同様の結果が、アミン基化 (amine based) したジアセチレンについて得られた (WalshおよびLando, Langmuir, 10:252[1994])。したがって、図22のシフトは、フィルムにおいて別々に解離した個々の成分によって誘導された混合静電効果

を反映するものであり、これは三成分フィルムが純粋なPDAフィルムと比較した場合に安定性が低いということを示すものである。

### III 下位相pHの最適化

酸性分子PDAに関し、pHの上昇によりPDA分子のイオン化が生じ、その結果、単分子層界面に沿って実質的な電荷が誘導された。図23には、pH4.5、5.8および9.2における5% $G_{41}$ /5%SA-PDA/90%PDAの等温線を示す。高pH(pH9.2)では、フィルムは、隣接するPDA分子間の静電反発力の結果、かなり膨張してきた。かかるフィルムを圧縮して単分子層を形成させることは困難である。さらに、個々の分子の別個のセグメントが観察され、これは分離したドメインを形成する傾向がある混合単分子層における不混和性傾向を示すものである。明らかに、単分子層界面における高電荷密度により水性表面において好ましくない相互作用が作り出された。 $G_{41}$ などの化合物(すなわち酸性のもの)をPDA混合物にこのpHで添加するのは好ましくないということが予想され得る。低pHにおける三成分系の等温線は、正常なピーク挙動を示す。圧潰圧は中性pHよりも有意に大きく、これは低pHにおいてより安定なフィルムが形成されるということを示すものである。このpHでのPDA分子のイオン化の抑制はフィルム安定性の増大に寄与するものであり、その結果、PDAフィルムの $G_{41}$ 分子の組込みを安定化することができる。

### IV 下位相温度の最適化

フィルムの製造中、温度を上昇させると、通常、表面圧が高くなり、膨張領域が拡大され、 $\pi/A$ 等温線において低分子領域方向への相転移点のシフトが生じ

る(Birdi, Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces, Plenum Press, New York[1989])。この効果は、熱攪拌の結果として高温における脂質の炭化水素尾の高い柔軟性から生ずるものであり、二次元クラウジウス-クラペイロンの式を用いて分析することができる(Birdi, 上記のとおり)。しかしながら、PDAを含む単分子層フィルムは、典型的に、圧縮中にフィルム圧潰を受ける。したがって、下位相温度効果の評価はこの現象を考慮に入れる必要がある。図24には、100%PDA、5%SA-PDA/95%PDA、および5% $G_{41}$ /5%SA

—PDA/90%PDAの等温線における温度効果を示す。下位相温度が減少するにつれて、表面圧は増大し、等温線の形が変化した。低温での等温線は、ピークの消失および転移領域における滑らかな曲線の発生によって示されるように、だんだん液—固相転移特性が大きくなった。3つの単分子層について得られた $\pi$ -A等温線は全て同様の特性を示す。これらの図間の主な相違は圧潰点の位置であり、これはフィルム組成の関数である。

#### V モノマーの重合性基の位置

アナライトに対する10,12-ペンタコサジイン酸リポソームと5,7-ドコサジイン酸 (Holy CrossカレッジのAlice Deckertから寄贈) リポソームの比色応答を比較することにより、自己集合性モノマー内の重合性基の位置の効果を測定した。 $C_{41}$ リガンドを各型のリポソームに組込んでコレラ毒素の検出を分析した。ガングリオシド $C_{41}$ を5mol%でジアセチレン「マトリックス脂質」モノマーと混合した。リポソームをプローブ音波処理法を用いて調製し、UV照射 (254nm) によって重合した。

ポリジアセチレンリポソームの結合エンーイン(ene-yne)主鎖により、見かけ上深青色／紫色の溶液が得られた。新たに調製された紫色のリポソームの可視吸収スペクトルを図25に示す。コレラ毒素を5% $C_{41}$ および95%5,7-ドコサジイン酸から構成されるリポソームに加えた場合、溶液はすぐに橙色に変化し、図26に示されているように、ポリジアセチレンの「赤色相」吸収が優位を占める。ガングリオシド $C_{41}$ を、5,7-ドコサジイン酸の代わりに10,12-ペンタコサジイン酸を含んでなるマトリックス脂質と混合した場合、比色応答は有意に低減された。

本発明を用いるのにその機構を理解する必要はなく、本発明をそのように限定するつもりはないが、5,7-ドコサジイン酸リポソームにより観察された感度の増大は、光学レポーター基をより界面の近くに配置すること（すなわち、8メチレン単位に対して3メチレン単位）から生じるものであると考えられる。ポリマー主鎖に対するC—C結合 $\beta$ についての小さな回転が効率的な結合長を変化させるのに十分であることがフーリエ変換IR分光分析によって示された(Bermanら, Sci

enc 259:515[1995])。これらのコンホメーションの変化は、より短いアルキル鎖長によってより簡単に変換される。

#### 実施例 4

##### ドーパントの組込み、最適化および特性

新しいセンサーシステムを設計するごとに、PDA、ドーパントおよびリガンド（例えば、ガングリオシド）の量を変えて最適センサーを作る。試験に対して典型的に0～100%の量を使用するが、最適システムは、5～15%のリガンド、0～95%のPDA、および0～95%のドーパントを使用することが明白である。各成分の割合はシステム、必要な安定性、および必要な感度に依存する。本発明のある特定の実施形態では、一以上の型のドーパントが生体高分子材料に組込まれ得る。

##### I 生体高分子材料へのドーパントの組込み

アミノ酸誘導体化ジアセチレンドーパントを比色リポソームに組込んだ。脂質（すなわち、ドーパントおよびジアセチレンモノマー）をまずクロロホルムに溶解し、アリコート反応バイアルに移した。 $N_2$ ガスを用いることによって有機溶媒を吹き飛ばし、適当な量の水を加えて脂質濃度を約1 mMにした。超音波処理を用いて白色沈殿を破壊することによりリポソームを形成した。典型的な音波処理時間は用いるドーパントの種類に依存して1時間～5時間で変化させた。音波処理中、温度を注意深く約80℃まで上昇させ、リポソームの生成を促進させた。音波処理は溶液が透明になるまで続けた。熱い溶液を5  $\mu$ MのMillipore Millex-SVフィルターでただちに濾過して溶液中に存在する可能性のある不純物を除

去した。得られた溶液は、使用前、一晚4℃で保管した。

重合後、深青色のリポソームが得られた。最終的なリポソームは、アミノ酸誘導体化ジアセチレンドーパントを含んでいた。

##### II ドーパント濃度の最適化

PDA、 $G_{41}$ （すなわち、リガンド）およびシアル酸誘導体化PDA（すなわち、ドーパント）を含むフィルムを、コレラ毒素の検出について実施例3のI項に記載されたようにして作製した。比色分析により、3つの成分全てが最適比色

応答に必要であることが示された。コレラ毒素の最適検出のためには、S A - P D A と  $G_{41}$  の両方がフィルム中に存在することが必要であり、さもなければ、フィルムは、3つの成分全ての濃度に依存して、非常に不安定であるか、十分に色を変化させない。本発明を用いるのにその機構を理解する必要はなく、本発明がそのように限定されるものではないが、S A - P D A の機能は、応力誘導機構によって生体分子認識に対してフィルムの準安定状態を提供するものであると考えられる(Charychら, Chem. and Biol. 3:113[1996])。1%  $G_{41}$  / 1% S A - P D A / 98% P D A からなるフィルムも調査した。C R は低いということが分かり、有用な比色バイオセンサーは得られなかった。図21に示されたように、最適比色センサーは、5%  $G_{41}$  / 5% S A - P D A / 90% P D A であることが確認された。したがって、5%モル含量のドーパントS A - P D A によりコレラ毒素の検出に対して最良のセンサーが得られる。

### III 誘導体化ジアセチレンドーパントの特性

ジアセチレンに連結された疎水性アミノ酸を用いることにより生体高分子材料の安定性およびフィルムまたはリポソームの安定性を低下させることができる。これらの誘導体化P D A は、互いに直接結びついている二つの因子、すなわち安定性および感度を微調整するために複雑なシステムのアセンブリにおいて有用であり得る。親水性P D A を含む疎水性P D A を用いることにより、種々の周囲環境条件下でフィルムおよびリポソームの安定性を大いに高めることができる。安定性の増大が観察されるが、感度を犠牲にしている。感度と安定のバランスを最

適化する必要がある。

ジアセチレンに連結した酸性および塩基性アミノ酸を用いることにより、材料の溶解性を高めることができる。つまり、このような変化によりポリジアセチレン脂質を水溶性生体分子と混合することができる。通常、P D A は水溶性ではなく、有機溶媒が必要である(すなわち、生体分子に対して有害であり得る)。酸性または塩基性ヘッド基をP D A 分子上に配置することにより、誘導体化P D A の溶解性が大いに高められた。また、それらは非常に明るい色を生じさせ、センサーのアセンブリにおいてより安定していた、これらの結果は、水溶性および全て



の成分間の混合の均一性の増大によるものであった。酸／塩基PDAは、非常に感度の大きいアミノ酸誘導ジアセチレンであった。

ヒスチジンをアミン結合PDAに結合することにより、容易に色が変わり得る、が再生することもできる材料を作り出した。このアプローチについての特定の利点は、通常、重合PDAは色が変わるが再び使用することができないということである。ヒスチジン材料のヘッド基についての中性付近のpKaによりこの利点が得られるものである。

蛍光PDAヘッド基をPDAアミン結合システム上に配置することにより、蛍光特性が付加された比色バイオセンサーを製造することができる。これは、多目的および高感度センサーを提供する。

#### 実施例 5

##### リガンドの結合

リガンドは自己集合性モノマーのヘッド基に共有結合され得るか(例えば、ジアセチレンモノマーに連結されたシアル酸)、重合材料の表面に共有結合され得るか(例えば、材料表面に対して多数のアミンおよびチオール結合を有するタンパク質および抗体)、または生体高分子材料に非共有結合的に組込まれ得る(例えば、フィルムおよびリポソームの膜に組込まれたガングリオシド)。

自己集合性モノマーは、当技術分野で一般的な合成技術を用いて広範な種類の化学ヘッド基官能性を含むように合成され得る。いくつかの実施態様においては、リガンドは、当技術分野で周知の合成方法を用いてこれらの官能基と化学反応

させることによって自己集合性モノマーに結合される。官能基としては、限定するものではないが、エステル、エーテル、アミノ、アミド、チオール、またはそれらの組合せが挙げられる。一方、多くのリガンドが界面活性剤(例えば、ガングリオシドおよびリポタンパク質のような疎水性領域をもつ膜タンパク質および分子)に共有結合することなく自己集合性マトリックスに組込まれ得る。

本発明の生体高分子材料と関連し得る広範な種類のリガンドを説明するために、本発明の特定の用途を下記に記載する。これらの例は、単に本発明の広範な適用性を説明するためのものであり、これらの特定の実施態様に本発明を限定する

ものではない。

## I シアル酸

シアル酸をリガンドとしてジアセチレンモノマーに結合させた。当技術分野で周知のいくつかの合成方法を用いることができる。その多くは、本発明の生体高分子材料への炭水化物の結合に対して一般的な適用性を有するものである。一つの実施態様においては、PDA (1.0g、2.7mmol、クロロホルム中) を、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (0.345g、3.0mmol) および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (0.596g、3.1mmol) と反応させた。溶液を2時間攪拌し、その後クロロホルムを蒸発させた。残渣をジエチルエーテルおよび水で抽出した。有機層を硫酸マグネシウム ( $MgSO_4$ ) で乾燥し、濾過した。次いで、溶媒をロータリーエバポレーターによって蒸発させて1.21gのN-スクシンイミジル-PDA (NHS-PDA) を得た。エタノールアミン (0.200ml、2.9mmol) をNHS-PDAの溶液 (1.21gを50mlのクロロホルムに溶かした溶液) に加えて、その後トリエチルアミン (0.350ml、2.5mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (2:1 EtOAc : ヘキサン、 $R_f = 0.15$ ) で精製することにより、0.99gのN-(2-ヒドロキシエチル)-PDAを得た。

25mlのクロロホルムに溶かしたテトラエチレングリコールジアミン (1.26g、6.60mmol) を、N-スクシンイミジル-PDA (0.603g、1.28mmol) を20mlのクロロホルムに溶かした溶液に30分以上かけて攪拌しながら滴下した。反応液を

さらに30分間攪拌した後、ロータリーエバポレーターによる蒸発によって溶媒を除去した。残渣をEtOAcに溶解し、水で2回抽出した。有機層を $MgSO_4$ で乾燥して、溶媒をロータリーエバポレーターにより除去した。抽出物をシリカゲルクロマトグラフィー (20:1  $CHCl_3$  : MeOH、 $R_f = 0.20$ ) で精製することにより、3.72gのN-(11-アミノ-3,6,9-トリオキシウンデカニル)-PDAを得た。

2 mlの無水酢酸を、エチル-5-N-アセチル-2,6-アンヒドロ-3,5-ジデオキシ-2-C-(2-プロペニル)-D-エリスロ-L-マンノノノンエート (mannonononate) (0.47g、1.30mmol) を1.7mlのピリジンに溶かした冷却溶液に、窒素下で攪拌しながら加え

た。反応液を一晩、室温で温めた。18時間後、溶媒を減圧下、周囲温度にて除去することにより粗粘性油が得られた。その油をトルエンから繰り返し蒸発させることによって結晶化させた。粗固体を溶離液として酢酸エチルを用いるシリカ上のフラッシュクロマトグラフィーにかけ、0.58gのエチル-5-N-アセチル-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-(2-プロペニル)-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエートを得た。

アセトン10mlにエチル-5-N-アセチル-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-(2-プロペニル)-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエート (0.38g、0.72mmol) を溶かした溶液を、CaCl<sub>2</sub>乾燥チューブを用いて水分から保護しながら、-78℃に冷却した。特徴である青色が5分間持続するまでオゾン溶液に吸引させた。反応液をO<sub>2</sub>でパージして過剰のO<sub>3</sub>を放散させ、その後5℃に温めた。赤橙色が持続するまで過剰のジョーンズ試薬 (7滴) を加え、次いで反応液を周囲温度まで温めた。数分後、エタノールを滴下し、過剰の酸化剤を消費した。緑色沈殿を濾過し、アセトンで数回洗浄した。濾液を合わせて減圧濃縮し、酢酸エチルに溶解した。溶液を飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で3回抽出した。水層を合わせて濃HClで酸性にし、塩化メチレンで5回抽出した。塩化メチレン抽出物を合わせてMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、減圧濃縮することにより、エチル-5-N-アセチル-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-(酢酸)-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエート (manno-nonate) を得た。

エチル-5-N-アセチル-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-(酢酸)-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエート (0.194g、0.35mmol) を、2mlのクロロホルム

ムにNH<sub>4</sub>S (0.058g、0.50mmol) およびEDC (0.096g、0.50mmol) を溶かした、冷却した溶液 (5℃) に窒素下で加えた。反応液を攪拌しながら5時間周囲温度に温めた。次いで、反応液を15mlのクロロホルムで希釈し、1NのHCl (水溶液) で2回、飽和重炭酸ナトリウム (水溶液) で2回、飽和塩化ナトリウム (水溶液) で1回洗浄した。有機層をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮することにより、エチル-5-N-アセチル-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-(N-スク

シンイミジルアセテート)-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエートが得られた。

エチル-5-N-アセチル-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-(N-スクシンイミジルアセテート)-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエート (0.143g、0.22 mmol) およびN-(11-アミノ-3,6,9-トリオキシウンデカニル)-PDA (0.133g、0.24mmol)を2 mlのクロロホルムに溶解し、反応液を密閉し、56時間攪拌した。溶液を15mlのクロロホルムで希釈し、飽和1 N HCl (水溶液) で2回、飽和重炭酸ナトリウム (水溶液) で2回、飽和塩化ナトリウム (水溶液) で1回洗浄した。有機層をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、濃縮することにより、粗半固体を得た。該物質をシリカ上のフラッシュクロマトグラフィー (20:1 CHCl<sub>3</sub> : MeOH) にかき、エチル-5-N-アセチル-4,5,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-[(N-11'-(PDA)-3',6',9'-トリオキシウンデカニル)アセタミド(acedamido)]-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエートを得た。

0.1gの水酸化ナトリウムを溶解した4 mlの水および0.5mlのメタノールにエチル-5-N-アセチル-4,5,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2-C-[(N-11'-(PDA)-3',6',9'-トリオキシウンデカニル)アセタミド]-D-エリスロ-L-マンノ-ノノンエート (0.20g、0.19mmol) を溶かすことによりシアル酸誘導PDAを形成させた。溶液を3時間攪拌し、イオン交換樹脂 (Biorad AG 50W-X4 H+体) を溶液がpH試験紙で酸性になるまで加えた。溶液を濾過し、濾液を減圧濃縮してシアル酸誘導PDAを得た。

## II 炭水化物

その他の実施態様においては、炭水化物 (すなわち、シアル酸など) を3段階法によって修飾することによりN-アリルグリコシドを製造することができる。次

いで、N-アリルグリコシドを当技術分野で公知の単純な化学合成法を用いてその他の分子 (例えばPDA) に簡単に連結することができる。この方法は、広範な炭水化物を生体高分子材料に組込むための手段を提供する (よって広範なアナライトを検出するための手段を提供する)。第1に、オリゴ糖を、生の(neat)アリアルミンに溶解して (必要に応じ、収率に悪影響を及ぼさない場合には、水が加えられ得る)、0.5~0.1M溶液を製造する。反応を停止させて、少なくとも48時間

攪拌する。出発原料がアミノグリコシド生成物に完全に転化したら、溶媒を蒸発除去し、粗固体を数回トルエンで処理して蒸発乾固させる。次いで、固体を氷浴中で冷却し、60%ピリジン、40%無水酢酸の溶液を加えて500モルパーセント過剰の無水酢酸を含む溶液を得る。反応を水分から保護し、攪拌し、一晚周囲温度に温める。溶媒を蒸発除去し、残渣を数回トルエンに溶解して蒸発乾固する。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーにかけて精製することにより、遊離糖の過アセチル化NAC-アリアルグリコシド体を得る。

次いで、過アセチル化NAC-アリアルグリコシドを無水メタノールに溶解して0.1~0.01M溶液を得る。NaOMeをMeOHに溶かした1Nの溶液を数滴加えて、反応液を周囲温度で3時間攪拌する。塩基を中和するのに十分なDowex 50樹脂(H<sup>+</sup>体)を加えて、次に溶液を濾過して蒸発乾固する(所望により再結晶による精製を行うことができる)。生成物は炭水化物のN-アリアルグリコシルアミド(glycosylamide)体である。これらの合成反応により、限定するものではないが、グルコース、NAC-グルコサミン、フコース、ラクトース、トリ-NAC-キトトリオース、Sulfo Lewis<sup>x</sup>類似体、およびSialyl Lewis<sup>x</sup>類似体などの種々の炭水化物のN-アリアルグリコシルアミド体が得られた。当業者は、広範な種類の炭水化物をジアセチレン脂質に結合させるためにこの方法を一般的に適用することができることを認識しているであろう。

### III. ガングリオシドG<sub>1</sub>

ガングリオシドG<sub>1</sub>は、自己集合性モノマーに共有結合させずにリガンドを組込むことの一例を示すものである。ガングリオシドG<sub>1</sub>を溶解したメタノール溶液を、PDAを溶解し乾燥させたクロロホルムと混ぜることによって、ガングリ

オシドG<sub>1</sub>を生体高分子材料に導入した。ガングリオシドは、自己集合性界面活性剤構造へのその組込みを促進する疎水性領域を含む。したがって、乾燥溶液を脱イオン水に再懸濁した場合、得られる構造にはガングリオシドとPDAの混合物が含まれていた。実施例1に記載されたように、再懸濁混合物からリポソームおよびその他の形が生じた。ガングリオシドは重合性基を含まないが、ガングリオシドはジアセチレンの架橋によって生じた重合マトリックスに包埋された。同

様の方法を、疎水性領域を含むその他のリガンド（例えば、膜貫通タンパク質およびリポタンパク質）の組込みに使用することができる。

#### IV. タンパク質

上記で製造したようなNHS-PDA、チオール連結PDA、および当技術分野で公知のその他の方法は、タンパク質と抗体の結合のための官能基を提供する。NHSまたはチオール連結モノマーは、所望の凝集体に組込まれ、重合される。次いで、NHSまたはチオール官能基は、当技術分野において標準的な化学合成反応を用いてタンパク質および抗体に共有結合させるための表面反応部位を提供する。別の実施態様においては、ヒドラジド官能基をPDA上に配置することができ、これによりタンパク質および抗体のアルデヒドおよびケトン基への連結が可能になる。これらの実施態様は、生体高分子材料上にタンパク質および抗体のかなり広範なアレイを組込むための手段を提供する。具体例を下記に示す。これらの実施例は、単に本発明の広範な適用性を説明するためのものであり、これらの特定の実施態様に本発明を限定するものではない。

##### A. ヘキソキナーゼ

NHS-PDA脂質を上記のようにして合成した。簡単に述べると、1.00gの10,12-ペンタコサジイン酸(pentacosadiynoic acid) (Farchan, ゲイネスビル(Gainesville), FL) を、 $\text{CHCl}_3$  (0.345gのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および0.596gの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩を加えたもの)に溶解した。溶液を室温で2時間攪拌し、その後ロータバップ(rotavap)を用いて $\text{CHCl}_3$ を除去した。残渣をEtOAcおよび水を用いて抽出した。

分離後、有機層を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過して溶媒除去した。次いで、未精製の生成物を $\text{CHCl}_3$ を用いて2回再結晶し、FT-IRで確認した。

1:1 (モル比) PDA/NHS-PDAクロロホルム溶液をラングミュアープロジェクトトラフ (KSVミニトラフ、KSV Instruments社、フィンランド) 上の水性下位相にマイクロシリンジを用いて広げた(下位相温度は5℃に維持した)。溶液を20分間放置することにより有機溶媒を蒸発させた。フィルムをコンパクト単分子層レベルまで圧縮し、次いでオクタデシルトリクロロシラン (OTS) で

被覆したガラススライドに垂直付着によって移した。圧縮および浸漬速度は5 mm/分に維持した。3つの層をガラススライド上に付着させて重合後に検出するのに十分な比色信号を得て、確実に親水性表面にするために溶液に曝した。

酵素固定前に安定なPDA単分子層フィルムを調製することは、バックグラウンドを低くし、センサーの再現性を高めるために重要である。ラングミュア単分子層トラフは、単分子層の表面圧潰圧(surface collapse pressure)の評価によってフィルムの安定性を測定するための方法を提供する。混合フィルム（すなわち、PDAおよびNHS-PDAを有するフィルム）は、1つの構成成分からなる単分子層よりもかなり安定であり、よって酵素固定により適していることがわかった。例えば、1:1 NHS-PDA/PDA単分子層についての5℃における圧潰圧は、57mN/mであり、一方NHS-PDA単分子層とPDA単分子層はそれぞれ34、28mN/mで潰れた。本発明を用いるのにその機構を理解する必要はなく、本発明をそのように限定するつもりはないが、恐らく種々の大きさのヘッド基を密に充填することを可能にする最適空間的配置により、相互作用がこれらの混合単分子層においてより好ましいと考えられる。

機械的安定度のほかに、単分子層は、センサーに適する好ましい光学特性（すなわち高い色強度）を有するべきである。フィルム品質、かかる特定の場合には色強度が、種々の付着圧にて研究された。40mN/mで製造されたフィルムによって最良の移動率および色強度が得られることが分かった。したがって、この移動圧で得られた1:1 NHS-PDA/PDAフィルムが、ヘキソキナーゼによる修飾のために選択された。

酵母ヘキソキナーゼ懸濁液（E.C.2.7.1.1、Boehringer Mannheim GmbH製、

ドイツ）をマイクロ遠心機で回転させ、飽和硫酸アンモニウムを除去した。タンパク質を0.1Mのリン酸緩衝液（pH8.0）に再溶解して約1 mg/ml濃度にし、同一緩衝液に対してSlide-A-Lyzer透析カセット（Pierce）を用いて3時間透析した。

PDA単分子層スライドを0.7cm×2.5cmの長方形片に切断し、ヘキソキナーゼ溶液中で4℃にて1時間インキュベートした。長時間インキュベートすると、恐らく化学架橋反応中のLB単分子層の脱落により、色強度が低下することが分かっ

た。次いで、単分子層チップを脱イオン水ですすぎ、0.1Mエタノールアミンに10分間浸漬して反応を終結させた。チップを再び脱イオン水ですすぎ、空気乾燥した。重合は、フィルムを手で支えたUVランプで照射することによって行った。照射時間は各側6分であった。長時間照射により、赤色への不可逆的な色変化が生じる。

#### B. 抗体

まず、市販のジアセチレンを濾過して不溶性不純物（例えば重合体）を除去し、上記のようにNHS-PDAに化学的に転化させた。適当な量のNHS-PDAおよびその他の形のPDA誘導体（例えば、ドーパントまたはリガンド）を混合して所望のモル比を得た。溶液をN<sub>2</sub>ガスを用いて乾燥し、白色物質の薄層をバイアルの底部に付着させた。脱イオン水を加えて脂質の合計濃度を約1mMにした。溶液を、約20分間プローブ音波処理機を用いるか、または2時間以上超音波処理機を用いることにより、透明な溶液が得られるまで音波処理した。溶液を加熱しながら5μmフィルターにより濾過し、次いで4℃で一晩保管した。

架橋前に、0.1Mのリン酸緩衝液（pH8.5）をリポソーム溶液に加えた。次いで、同様の緩衝液に溶解した抗体を加え、溶液を4℃で一晩保管した。遠心分離または透析によって過剰の抗体を除去した。遠心分離を用いた場合、ペレットを氷浴を用いて穏やかに超音波処理した。音波処理した材料への抗体の会合後、重合を実施例1のリポソームについて記載したようにして行った。

また、抗体をヒドラジドにより生体高分子材料に結合させることもできる。いくつかの実施態様においては、これは、NHS-カップリングに対して好ましくあり得る。というのは、NHSは抗体のFab'領域で反応し得るものであり、アナ

ライトへの結合をブロックするからである。ヒドラジド法は、抗体のFc領域の、生体高分子材料への結合を生じさせ、結合領域を利用可能な状態に保つ。ヒドラジド法においては、ヒドラジド-PDA脂質が製造され、非重合リポソームが生じる（例えば、20%ヒドラジドPDA/80%TRCDA）。Centricon50フィルターを用いて、500μlの保存抗体溶液を、等容量の123mMクエン酸ナトリウム（pH5.5）を加えることによって洗浄し、4000rpmで9分間回転させた。濾過工程を2



回以上繰り返した。次に、抗体を加えたクエン酸緩衝液400マイクロリットルを、 $25\mu\text{l}$ の過ヨウ素酸ナトリウムとともに $22^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートすることにより酸化した。2時間後、 $50\mu\text{l}$ のN-アセチルメチオニンを加えることによって反応を停止させた。次に、 $300\mu\text{l}$ のリポソーム、 $150\mu\text{l}$ のクエン酸緩衝液、 $400\mu\text{l}$ の水、および $200\mu\text{l}$ の酸化抗体を $22^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。Centricon 500フィルターを使用し、 $900\mu\text{l}$ のトリス緩衝液 (pH9.0) で洗浄し、4000 rpmで2分間遠心分離することによって非結合抗体をリポソームから除去する。多数回洗浄した後、試料を(必要に応じて)トリス緩衝液で希釈して、 $0.2\text{mM}$  (以下) のリポソーム溶液を製造する。

#### V. その他 (アミノ酸、ヌクレオチド等)

上記、および図9に示したように、アミン連結によりアミノ酸のジアセチレンへの結合が得られた。アミノ酸の脂質への結合についての種々のその他の手段も当技術分野で公知である。

種々の異なる化学ヘッド基種を含むPDA-連結リガンドの作製は、VOC検出に対して実施例7に記載されている。これらの例は、親水性の電荷を持たないヒドロキシル基、第1級アミン官能基、アミノ酸誘導体、および疎水性基のような広範な種類の化学ヘッド基によるPDAの誘導を示すものである。このような修飾およびその他の修飾は、当技術分野で公知の合成法によって行われる。

その他の実施態様においては、種々のその他の界面活性剤連結リガンドが、活性化カルボン酸基および求核性アミノまたはヒドロキシが関与する縮合反応を用いて調製され得る。PDAを無水条件下でトリメチルアセチルクロリドを用いて活性化することにより、活性非対称性無水物を形成させることができる。この無

水物を、過剰のエチレンジアミンまたはエタノールアミンで処理することにより、それぞれ、エチレンジアミノ-PDA (EDA-PDA) またはエタノールアミノ-PDA (EA-PDA) を形成させることができる。1モルまたは半モル当量のトリエチルアミンを触媒塩基として加えて、室温で3時間反応を続行させる。EDA-PDAおよびEA-PDAをシリカゲルカラムおよびクロロホルム/メタノール勾配を用いるクロマトグラフィーにより精製する。次いで、EDA

－PDAまたはEA－PDAを、リガンド（上記のように化学的に活性化したもの）を含む遊離カルボン酸とともに濃縮してリガンド連結重合性界面活性剤を形成させる。この方法により調製され得るリガンドの代表例としては、限定するものではないが、炭水化物、ヌクレオチド、およびビオチンが挙げられる。

この技術には、脂質および膜に分子をうまく連結または会合させることについての多数のその他の例が含まれる。リガンドと会合した自己集合性モノマーは、鎖長が改良され得るものであり、二重または多重鎖からなり得る。リガンドとモノマーのこのような種々の組合せにより、所望の比色応答、選択性、および感度を有する、広範な種類のアナライトとの相互作用に適した生体高分子材料のかなり広範なアレイが得られる。

## 実施例 6

### 比色分析

#### I. 視覚検出

好ましい実施態様においては、本発明の生体高分子材料の比色変化は、ヒトの目による単純な観察によって検出される。観察が単純なことから、家庭での使用者のような訓練されていない観察者によってもこの目的が達成され得る。

#### II. 可視吸収分光分析法

いくつかの実施態様においては、比色応答の正確な定量的データを得たり、ヒトの目によって検出不能な、微妙な変化またはかすかな信号を記録するのが好ましくあり得る。分光分析法はそのようなデータを得るために適用され得る。

可視吸収研究は、Hewlett Packard 8452Aダイオードアレイ分光光度計を用いて行った。PDA材料（すなわち、フィルムおよびリポソーム）に対しては、

比色応答（CR）は、全吸収極大に対する626nm（すなわち、材料に青色を付与する）における吸収の変化の割合を測定することによって定量した。

所与の量のアナライトに対する生体高分子材料の応答を定量するために、アナライトを含まない生体高分子材料の可視吸収スペクトルを

$$B_0 = I_{626} / (I_{536} + I_{626})$$

（式中、 $B_0$ は626nmにおける吸収の強度を536および626nmにおける吸収強度の合

計で割ったものとして定義される。)

として分析した。アナライトに曝された生体高分子材料を、同様の様式で、

$$B_a = I_{626} / (I_{536} + I_{626})$$

(式中、 $B_a$ はアナライトとインキュベートした後の新たな吸収の強度の割合を示す。)

として分析した。リポソーム溶液の比色応答(CR)は、アナライトに暴露した場合のBの変化の割合として定義される。

$$CR = [(B_0 - B_a) / B_0] \times 100\%$$

#### 実施例7

##### アナライトの検出

本発明によって教示された広範な種類の生体高分子材料により、多数のアナライトの検出が可能になる。そのようなアナライトは、複雑な生物学的有機体(例えば、ウイルス、細菌、および寄生生物)から単純な小さい有機分子(例えば、アルコールおよび糖)に及ぶ。本発明の具体的な用途を、アナライト検出システムの範囲に対する本発明の広範な適用性を説明するため、およびその特異性および使用の容易さを示すために下記に示す。これらの例は、単に本発明の広範な適用性を説明するためのものである。本発明はこれらの特定の実施態様に限定されるものではない。

##### I. インフルエンザウイルスの検出

本発明は、現在利用可能な技術と比べて、インフルエンザの優れた検出手段を提供する。免疫学的アッセイは、ウイルスが示す抗原シフトおよびドリフトのた

めに制限される。本発明は、全ての種類のインフルエンザを検出するものであり、よってインフルエンザへの患者の暴露の判断が決定的なものとなり、特定の株に限定されない。実際、新たに進化した特性付けられていないインフルエンザ株を検出することができる。

シアル酸連結生体高分子材料を実施例1および実施例5に記載したようにして作製した。この材料をインフルエンザウイルスに曝し、比色情報を視覚的に観察するか、または実施例6に記載されたように分光分析法で観察し、青色(実線)

および赤色相（点線）材料についてそれぞれ図27に示した。リポソームに対しては、以前の研究により、最適ウイルス結合はリポソームに1~10%混合した物に対して生じるということが示されていたので(Spevakら, J. Am. Chem. Soc. 161:1146[1993])、シアル酸連結PCAの1~10%混合物を組込んだ。

シリケートガラスに閉じ込めたりポソーム（すなわち、ゾルーゲル法により調製したりポソーム）については、5,7-DCDAが10,12-PCAよりも鮮明な比色応答をもたらすことが分かった。5,7-DCDAによる応答の向上は、その機構の理解は本発明の実施には必要ないが、ゾルーゲル法のサイズ制限および比色遷移に応答可能なコンホメーションの変化についてのトポ化学的性質に関係するものであると考えられる。

一つの実施態様においては、リポソーム溶液を含むシアル酸連結PCAの5~10分間の照射により深青色のリポソームが生成し、一方、10~30分間の重合により紫色が生じる。インフルエンザウイルスがリポソームに加えられた場合、材料はピンク色または橙色に変化し、これはそれぞれ初期の調製物が青色であったか紫色であったかに依存する。このような色変化は、裸眼で容易に見ることができた。

競合阻害実験を、リガンド-アナライト相互作用の特異性を示すために行った。わずかに過剰の $\alpha$ -O-メチル-ノイラマチン酸(neuramatic acid)（インフルエンザウイルス血液凝集反応に対する公知の阻害剤）を用いた以外は上記のようにして実験を行った。阻害剤の存在により、生体高分子材料の検出可能な色変化は生じなかった。

インフルエンザウイルス検出システムは、インフルエンザ株または血清型をお互いからそしてその他の病原体から認識し、区別する追加のリガンドを含むことが考えられる。

本発明の生体高分子材料を含むシアル酸は、多くのその他の病原体の検出手段を提供する。インフルエンザウイルスに加えて、シアル酸は、その他のアナライト、限定するものではないが、HIV、クラミジア、レオウイルス、ストレプトコッカス・スイス(*Streptococcus suis*)、サルモネラ(*Salmonella*)、センダイウ

イルス、おたふくかぜ、ニューキャッスル、ミクソウイルス、ナイセリア・メニ  
ンジティデイス (*Neisseria meningitidis*) などの検出能を有する。

## II. コレラ毒素の検出

コレラ毒素は、ヒトに潜在的に致死性下痢疾患を引き起こすグラム陰性菌 *Vibrio cholerae* のエンドトキシンである。コレラ毒素は、化学量論 A B で二つのサブユニット A (27kDa) および B (11.6kDa) から構成される。B 成分は、細胞表面上の  $G_{M1}$  ガングリオシドに特異的に結合し、最終的に  $A_1$  断片の膜を通過するトランスロケーションを生じさせる。コレラ毒素は、Pan および Charych (Langmuir 13:1365 [1997]) によって示されたように、 $G_{M1}$ -含有支持脂質膜ならびに  $G_{M1}$  および炭水化物「プロモーター」脂質を含む重合ラングミュア-プロジェットフィルムにより認識され得る。

ガングリオシド  $G_{M1}$ 、*Vibrio Cholerae* 由来のコレラ毒素、ヒト血清アルブミンおよび小麦胚芽凝集素は Sigma から購入した。5,7-ドコサジイン酸は合成した。脱イオン水は蒸留水を Milipore  $\mu$ F 超精製トレインに通すことによって得られた。用いた溶媒は試薬グレードであった。ガングリオシド  $G_{M1}$  はジアセチレン「マトリックス脂質」モノマーと 5 mol% で混合した。リポソームは、プローブ音波処理法を用いて調製し、UV 照射 (254nm) により重合した。ポリジアセチレンリポソームの結合エンーイン主鎖により、外観上深青色／紫色の溶液が生じた。新たに調製した紫色リポソームの可視吸収スペクトルを図 25 に示す。

比色検定のために、コレラ毒素を 50mM トリス緩衝液、pH7.0 で 1 mg/ml に希釈した。500  $\mu$ l のガラスキュベット内で、上記のようにして製造した青色相リポソームを 50mM トリス緩衝液、pH7.0 で 1 : 5 に希釈した。リポソームを緩衝液

中で 15~30 分間予備インキュベートして、コレラ毒素の添加前に青色相の安定性を確保した。この間、色の変化は観察されなかった。

コレラ毒素を連続添加法によりキュベットに加えた。それぞれの添加の後、内容物を混合し、可視吸収スペクトルを時間の関数として記録した。典型的には、図 26 に示したように、95% の吸収変化が、毒素添加後の最初の 2 分以内で生じることが観察された。各実験後、キュベットの内容物を白色マイクロタイターブ

レートの1個のウェルに移した。コレラ処理リポソームのピンク-橙色を、青色陰性対照を用いて視覚的に確かめた。

ガングリオシド $G_{M1}$ リガンドがリポソームから除去されている場合、陰性応答が観察された。同様に、コレラ毒素以外のその他のタンパク質が同等の量 $G_{M1}$ -含有リポソームに加えられる場合、陰性応答が得られた。これには、ヒト血清アルブミン、アビジン、および小麦胚芽凝集素が含まれる。

速度論的実験により、色変化の95%以上が毒素添加の最初の2分以内に生じることが分かる。図28に示したように、色遷移は、全か無かの作用ではなく、溶液に加えられた毒素の量に依存する。S字状の挙動は、比色遷移の協同性を示唆するものである。本発明を用いるためにその機構を理解する必要はなく、本発明をそのように限定するつもりはないが、これは、 $G_{M1}$ リガンドへの毒素の結合が好都合にそれに続く毒素を結合させるという意味で結合自体が協同的であるということを示し得るものであると考えられる。一方、この結果は、脂質-ポリマー側鎖コンホメーションおよびポリジアセチレン主鎖の有効な結合長におけるその結果の点から理解されるのがより適切であり得る。有効結合長が毒素結合の結果として低減されると、脂質-ポリマー主鎖の残りのその後の摂動はより好都合になり得る。

### III. E.coli毒素の検出

リポソームを5 mol%の $G_{M1}$ および95%の5,7-DCDAを用いて調製した。比色検定のために、E.coli毒素 (Sigma) を30K分子量カットオフフィルターを通して2000×gで15℃にて回転させて塩を除去した。タンパク質を50mMのトリス緩衝液、pH7.0で再希釈して、1 mg/mlの最終濃度にした。

図29には、E.coli毒素に曝す前の5% $G_{M1}$ リガンドおよび95%5,7-DCDAを含むポリマー性リポソームの可視吸収スペクトルを示す。プラスチック製使い捨てキュベット内でリポソームを50mMのトリス緩衝液、pH8.0で希釈して、最終濃度0.2mMにした。キュベット内の溶液は裸眼で見た場合紫色であった。

キュベット内のリポソーム溶液に40 $\mu$ lの上記E.coliを加え、試料を10分間インキュベートした。図30に示したように、可視吸収スペクトルを再び記録した

。キュベット内の溶液は、毒素を添加した後に裸眼で見たところ、添加前の紫色に対してピンク色であった。図29および30の吸収スペクトルは、観察された色変化を確認するものである。

#### IV. その他の病原体の検出

また、本発明は、種々のその他の病原体の検出にも使用され得る。多数の病原体に特異的なリガンド（例えば、炭水化物、タンパク質および抗体）は、上記の、そして当技術分野で公知の所定の化学合成法を用いて生体高分子材料に組込むことができる。病原体検出システムの例のいくつかが、本発明を用いて適用され得る種々の方法を説明し、単独のリガンド種（例えばシアル酸）の広範な検出能力を説明するために下記に示される。

*Plasmodium*（マラリアを引き起こす病原体）などの寄生生物の存在が検出するために本発明のシアル酸誘導化材料が用いられた。これらの実施態様においては、遺伝的に保存された宿主結合部位が利用された。上記のようなシアル酸を含むPDAフィルムをマラリア寄生生物および赤血球を含む溶液に曝した。寄生生物に一晩曝した後、フィルムはピンク色になった。各場合の色応答（CR）はほぼ100%であった。このシステムを、その他の試験材料（例えば、種々のリガンドを有する生体高分子材料のアレイ）とともに用いることにより、特に*Plasmodium*の毒性の種もしくは株（例えば、*P. falciparum*）またはその他の病原体の存在が同定され、区別されるものと考えられる。

さらに別の実施態様においては、リガンドとして抗体を用いることにより、ナイセリア・ゴノレエ(*Neisseria gonorrhoeae*)およびビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)の存在がうまく検出された。生体高分子材料への抗体の組み

みは実施例5に記載されている。

これらの実施例から明らかなように、本発明は、細菌、ウイルス、寄生生物などの広範な種類の病原体を検出するための種々の手段を提供する。

#### V. 揮発性有機化学物質（VOC）の検出

本発明の一定の実施態様は、揮発性有機化合物（VOC）を比色分析的に検出

するための手段を提供する。現在のVOC検出方法の大部分は、試料をガスクロマトグラフィー／質量スペクトルによって分析される実験室設備に取りこむ必要がある。現場での方法論のいくつかは、分光学的分析で用いられるもののような、機器の大きなかさばる部品を必要とする。これらの方法は、混入物を定量および同定するのに優れているが、個々の作業者の安全を確保することができない。一つの実施態様においては、本発明は、有害なVOCの存在を示し、VOCを含む領域内における最大限の作業場の安全性を提供する固定化生体高分子材料を含むバッジを提供する。このバッジは、読み取るのが容易かつ単純であり、着用者のほうに分析するための専門的知識は必要ない。バッジの色変化は、個人に適切な行動をとるように合図するものである。バッジは費用を低減し、環境管理および修復作業の効率を向上させ、潜在的に有害な物質への過度の暴露を防止することによって作業者の病気による中断時間を有意に低減する。

VOC検出に対する2つの主なアプローチが、種々のグループによって採用された。第1は、VOC検出のために改良されたGC/MSのような伝統的な分析技術が関係する（すなわち、器具を基本とするアプローチ）（Karpeら, J. Chromatography A 708:105[1995]）。しかしながら、これらの方法は高価であり、複雑であり、現場や家庭での使用に適していない。第2は、検出器表面への脂質膜のカップリングが関係する（すなわち、有機的-装置アプローチ）。過去10年間、有機フィルムによる圧電質量てんびんのコーティングが関与するいくつかのセンサー-装置が研究されている。コーティングの非選択的性質のため、これらはアレイにおいて研究された。石英結晶微量てんびん（QCM）および表面音波（SAW）装置のようなこれらのセンサー（例えば、Rose-Pehrssonら, Anal. Chem. 60:2801[1988]）を参照されたい。）は、適用された質量とともに線形振動数変化を有する。結晶にポリマーまたはその他のコーティングを塗布することによっ

て、QCMまたはSAWに基づいたセンサーが構築される。SAW、QCMの使用には複雑なエレクトロニクスが関与しており、電極基システムは、これらのアプローチを個人的安全装置として使用するための適用性を低下させる。

本発明は、信号伝達が電子式装置への信号伝達である代わりに有機層構造の不



可欠な部分であり、これらの方法とは異なる。さらに、本発明の実施態様は、電子の検出の代わりに信号の光学検出を促進する。さらに、本発明は、材料設計における柔軟性を提供し、電子機器が必要である代わりに小さいカートリッジ（例えばバッジ）に容易に固定することができる。

本発明の開発中、揮発性有機溶媒と一定の脂質-ポリマー膜との相互作用によって強い青色から赤色への遷移が生じることが観察された。図31の曲線は、青色相におけるPCAフィルムの吸収スペクトルを示すものである。フィルムは、水に溶解した約500ppmの1-オクタノールに暴露することにより、赤色相PCAに移行する。分析される種々の溶媒に対して、色変化の程度は、一般的に、溶媒の濃度に依存し、またハロゲン化および芳香族性の程度とともに増大する。この研究において、PCAの単一成分薄膜フィルムを調製し、UV暴露（254nm）によって青色状態に重合した。これらの材料は、水混和性溶媒よりも水非混和性溶媒に対して感度が高い。混和性アルコールについては、イソプロパノールがエタノールと比べて応答が劇的に増大することが分かった。これは、恐らく膜への溶媒相互作用の程度がより大きいためである。水不混和性溶媒については、0.05重量%（500ppm）で測定可能な色変化が得られた。このグループ内では、アルコールの鎖長の増大、ならびに塩素化の程度の増大とともに同様の傾向が観察された。図32AおよびBに示したように、広範な種類の水不混和性溶媒をその水飽和濃度で調べた。B項に示したように、それぞれの濃度は異なっている。図32Aにおいて、y軸は比色応答、または青色-赤色転化の程度を示す。バーの上方の数字は、検出の上限（ppm）を示す。これらの溶媒の多くについて、500ppmよりもかなり低い溶媒濃度を検出することができることが明らかである。

水に対して比較的高い溶解度を有する不混和性溶媒について、比色応答における溶媒濃度の効果を調べることができた。1-ブタノールについて図33に示したように、比色応答と0.05~8重量%の範囲の水中の溶媒濃度の間に線形関係が存在することが分かった。

薬化学工業では、薬学化合物は典型的に溶媒の存在下で生じる有機化学反応によって製造されるので、溶媒センサーが必要とされている。ヒトまたはその他の

動物に使用するための薬剤をパッケージングする前に、溶媒を完全に除去しなければならない(CarcyおよびKowalski, Anal. Chem. 60:541[1988])。現在用いられているこれらのVOCの検出方法は、薬剤に熱風を吹きつけるための強力なエネルギーのドライヤーおよび種々の溶媒の蒸発を分析するための圧電結晶アレイを使用するものである(Carey, Trends in Anal. Chem. 13:210[1993])。本明細書で特許請求した本発明は、これらの測定をとて簡単にする比色に基づくアプローチを提供する。

さらに、非工業的な屋内の空気環境におけるVOCの分析的定量方法における関心がここ数年劇的に高まっている。これは、主に、一般の家庭電化製品またはオフィス設備からの放出、ならびに制御建築物換気装置の向きに対する意識が高まっていることによるものである。家庭用製品を製造する会社は、危険なVOCのin-situでの存在を推測することができる、空気サンプリングしてその後実験室分析をする必要のない屋内空気モニターを供給することによって、この増大した必要性に応えることに関心をもっている。特許請求した本発明は、そのような手段を達成するための実施態様を提供する。実際、本発明の実施態様は、空気サンプリングの増大をもたらすものであり、カートリッジは、個人または一般空気サンプリング用の小さい携帯用のバッテリー作動ポンプに接続され得る。

#### VI. その他の小さい有機分子の検出

図34の化合物1および2のような、一定の包接化合物、またはキレートは、有機溶媒の蒸気に対する高度に選択的な吸着剤であることが示されている(Ehlenら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Vol.32, p.110[1993])。例えば、化合物1はジオキサンに対して高い親和性を有し、ブタノール、アセトン、メタノール、2-プロパノール、シクロヘキサン、トルエンおよび水に対してほとんど親和性をもたない。一方、化合物2は1-ブタノールに対して同一グループの溶媒よりも高い親和性を示す。

本実施例の目的は、小さな有機化合物を特異的にトラップする機能性材料の新

規クラスの開発を示し、視覚的に検出することができる比色変化による封じ込み(entrapment)事象を報告することである。これらの材料は、空気または水流中の

溶媒またはその他の毒性汚染物質のような化合物の存在を検出する簡単な色に基づくセンサー装置として作用する。

第1工程は、図34に示したような化合物1および2の脂質ジアセチレン類似体の合成を含む。この図において、PDA（ペンタコサジイン酸）3の鏡像異性体的に純粋なエステルは、過酸化モリブデンの酸化によりヒドロキシル化されてアルコール4になる。ジアステレオマーを分離し、エステルを加水分解してキラルな乳酸類似体5および6にする。エチルエステルを形成させ、グリニャール試薬で処理することにより所望のキラル脂質類似体7および8を得る。R基を変化させることにより、特異的封じ込め能力が検討される広範な種類の新規材料が得られる。

モノマー脂質包接化合物は、ラングミュアープロジェクトフィルム装置を用いて水表面上で整列しており、圧縮されている。UV照射による単分子層の重合により、上記のような青色材料が得られる。フィルムを疎水性化した顕微鏡スライド上に持ち上げる。これらの材料をアナライト（例えば、1-ブタノールまたはジオキサン）に暴露することにより、比色応答が生じる。

#### VII. ヘキソキナーゼリガンドによるグルコースの検出

比色測定について、光学特性を測定するために、上記のようなヘキソキナーゼ修飾フィルムをシラン化ガラスカバースライド上に置いた。バイオセンサー被覆ガラスカバースライドをガラスキュベット内に入れ、ヘキソキナーゼ修飾フィルムのUV-可視スペクトルを0.1Mリン酸緩衝液（pH6.5）中で記録した。この緩衝液中での測定をバックグラウンドとした。グルコース、またはその他の糖代用物は、キュベットに直接添加した。図35は、グルコースを添加した場合のヘキソキナーゼ修飾PDA単分子層のUV-可視スペクトルをインキュベーション時間の関数として示すものであり、（A）バックグラウンド（0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5）；（B）10.0mMグルコース添加後の $t = 0.02$ 分）；（C）10.0mMグルコース添加後の $t = 30$ 分；および（D）10.0mMグルコース添加後の $t = 60$ 分を示す。

グルコースの添加が550nmにおける吸光度の増大により反映されるような即時応答を引き起こすことは明らかである。応答は時間とともに増大し、60分後にそ

のピークに到達する。比色応答 (CR) は、上で定義したように、 $t = 0.02$ 、30、60分に対してそれぞれ5.2、13.7、および17.1%であった。色変化はこれらの条件下で不可逆的であった。

グルコースセンサーの選択性を、図36に示したようなグルコースと構造的に類似した糖化合物を用いて調べた。試験は全て0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.5) 中で行った。右側の2番目～最後のカラムは、固定化ヘキソキナーゼをもたないPDA単分子層におけるグルコース攪拌を示すものである。グルコースについてのサンプリング数 ( $n$ ) は、 $n = 6$  であり、残りは  $n = 3$  である。10.0mMソルビトール、ガラクトースおよびスクロースの添加はセンサーのきっかけとはならなかった。これは、センサーが糖グルコースに対してかなり特異的であるということを示唆するものである。センサーの活性化の機構をさらに調べるために、固定化ヘキソキナーゼをもたないPDA単分子層を試験した。 $t = 60$ 分におけるCRはヘキソキナーゼ結合PDA単分子層のバックグラウンドと同等であるので、有意な応答は観察されなかった。この結果により、グルコースは単独でPDAフィルムの色変化を誘導することができないということが示された。センサーをグルコースに応答させるには固定化ヘキソキナーゼの存在が必要であった。

#### VIII. その他の実施例

上記の実施例は、複雑な生物学的有機体 (例えばウイルス、細菌、および寄生生物) から単純な小さい有機分子 (例えばアルコール) に及ぶ、特許請求した本発明により検出可能な広範な種類のアナライトを示すものである。いくつかのその他のアナライトが、限定するものではないが、ガングリオシドを組込んだPDAを用いて検出されたボツリヌス菌神経毒など、の生体高分子材料に連結されたりリガンドを用いてうまく検出されている (PanおよびCharych, *Langmuir* 13:1367 [1997])。広範な種類のアナライトを検出するために、多数の種類のリガンドが当技術分野で公知の標準的な化学合成技術を用いて自己集合性モノマーに連結されるものと考えられる。さらに、その他の多くの種類のリガンドを自己集合性モノマーへ共有結合させることなく生体高分子材料へ組み込むことができる。こ

れらの材料は、小さな分子、病原体、細菌、膜受容体、膜断片、揮発性有機化合

物、酵素、薬剤、およびその他の多くの関連材料の検出を可能にする。

特許請求した本発明は、種々のその他の用途におけるセンサーとしての使用も見出すものである。PDA材料の色遷移は、温度およびpHの変化に影響される。したがって、特許請求した本発明の方法および組成物は、温度およびpH検出器としての使用も見出すものである。

また、リガンドも、それらがアナライトに対する競合バインダーとして機能する場合、本発明において使用することができる。例えば、アナライトに対する天然受容体の存在下でアナライトに対する比色応答を測定することによって、天然受容体の量および／または結合親和性を測定することができる。競合または阻害技術を用いることにより、非常に小さい、あまり反応しない化合物、ならびに非常に低濃度で存在する物質または少数の1価(single valiancy)の物質を試験することができる。この技術の一つの用途は、天然の結合事象の競合阻害を観察するためのスクリーニングアッセイを提供することにより、薬剤の開発および改良のための手段としての使用を見出すものである。特許請求した本発明の組成物は、さらに、所望の材料の結合を比色分析的に観察することができ、その関連リガンドを有する関連生体高分子材料を特定のポリマー構造から分離することによってその他のものから分離することができるので、材料のライブラリーの試験方法を提供する。

## 実施例 8

### 生体高分子材料の固定

#### I. シリコンチップおよびゲルの固定

シリコンゲルまたはウェハーを、1 : 1 HCl / メタノールで酸洗浄し、水ですすいで濃硫酸中に入れる。徹底的に水ですすいだ後、ウェハーチップまたはゲルを2段蒸留した脱イオン水中で煮沸し、冷却し、乾燥して乾燥トルエン中で調製した3-メルカプトプロピルトリメトキシシランの2%溶液中で不活性雰囲気下でシラン化する。次に、チップまたはゲルを、0.1Mリン酸緩衝液（最初に架橋剤を

最小量のジメチルホルムアミド中に溶解する）中で調製したGMB S（N-スクシンイミジル4-マレイミドブチレート）またはEMC S（N-スクシンイミジル6

マレイミドカプロエート)の2 mM溶液に入れる。リン酸緩衝液ですすいだ後、チップを、pH8.0のリン酸緩衝液中で調製したリポソームの0.05mg/ml溶液に入れる。最後に、使用前に、チップまたはゲルを緩衝液で徹底的にすすいだ後、緩衝液中で保管する。リポソームは、作用するためにGMB SまたはEMC Sと架橋するための-NH<sub>2</sub>基を有するべきである。

## II. 生体高分子材料のゾルーゲル封じ込め

15.25gのテトラメチルオルトシリケート(TMOS)、3.35gの水、および0.22mlの0.04N塩酸水溶液を冷却浴内で溶液が1相になるまで(約20分)音波処理することによってシリカゾルを調製した。次いで、冷却MOPS緩衝液(50% v/v)を酸性ゾルに加えて、溶液を氷浴中で十分に冷却することによりゲル化が遅延されたことを確かめる。限定するものではないが、任意のテトラアルコキシシランまたは有機的に修飾されたシラン(例えばオルモシル(ormosil))などの種々の材料がシリカゾルの製造に適している。さらに、テトラエチルオルトシリケート(TEOS)、メチルトリエトキシシラン(MeTEOS)、アリアルシルセスキオキサン、およびその他の金属酸化物がゾルーゲルガラスの製造において使用される。

次いで、リポソームの封じ込めのために、重合性リポソーム溶液(2.5ml)(実施例1で製造したようなもの)を緩衝化ゾル(10ml)に混合し、混合物をプラスチック製キュベットに注ぎ、平らな表面上にフィルムとして適用し、任意のその他の好ましい成型鑄型に注ぎ、Parafilmで密封し、周囲温度でゲル化させた。試料のゲル化が数分以内に生じ、キュベットで形成したゲルの場合、p-PDAリポソームを有する紫色のモノリスとして透明なモノリシック固体(18mm×10mm×5mm)が得られた。シネレシスにより熟成モノリスのわずかな収縮が観察された。

その他の生体高分子材料形(すなわちフィルムおよびその他のナノ構造物)の封じ込めは上記のようにして行うことができる。材料は、小さいサイズでない場

合には、小さい断片に作製するか、切り分けて、緩衝化ゾルと混合される溶液に組込む必要がある。

## 実施例9

## アレイの作製

いくつかの実施態様においては、本発明は、アレイを作成するために異なるヘッド基の化学的性質を有する重合性脂質の大きなパレットの製造を含むものである。特に、カルボン酸基(負の形式電荷を付与する)、親水性の荷電していないヒドロキシ基、第1級アミン基(正の形式電荷を付与し得る)、アミノ誘導体(正、負または両性イオン性電荷を有する)、および疎水性基を有するヘッド基を含む脂質が製造され得る。本発明のいくつかの実施態様においては、1個の装置にこれらの材料を組合せることにより、種々のアナライトの同時検出またはバックグラウンドの妨害物質からの所望のアナライトの識別が容易になる。いくつかの実施態様においては、種々のドーパント材料を含む生体高分子材料は、アレイの各部分に異なる色パターンを付与するために用いられる。

例えば、異なるヘッド基の化学的性質を有する重合性脂質の大きなパレットを製造してアレイを作成することができる。例えば、図37は、種々のヘッド基の化学的性質を有する脂質を示す。これらは、それらのヘッド基の官能性に基づいて5つのグループに分類され得る。化合物2.4および2.5は、カルボン酸基を含み、負の形式電荷を付与する。化合物2.6および2.7は、親水性の荷電していないヒドロキシ基を含む。化合物2.8および2.9は正の形式電荷を付与し得る第1級アミン基を有する。アミノ酸誘導体2.10は、正、負または両性イオン性電荷を有し得る。化合物2.11~2.13は疎水性ヘッド基を有する。

これらの脂質の合成は、市販のPDA(2.4)から出発する。2.10、2.12および2.13を除く全ての合成は、上記のようにPDA(NHS-PDA)の活性化N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルを利用してそれぞれのヘッド基をPDAにカップリングすることにより行われ得る。アミノ酸脂質2.10は、図38に示したように、水素化リチウムアルミニウムおよびアルコールの対応する臭化物誘導体への変換を用いてPDAから4段階で調製され得る。臭化物を、水素化ナトリウム

を含むアセトニトリル中でジエチルN-アセトイミドマロネートと反応させることにより保護化アミノ酸に転化し、その後脱保護する。フッ素化脂質2.12および2.

13は、ペンタフルオロベンゾイルクロリドをアミノ脂質2.8および2.9と反応させることによって調製され得る。

上記のようにして調製された材料は、装置のチャンバー内に置かれるか、装置の特定の部分に固定され得る。1個の装置内で種々の特性（例えば、アナライトまたは反応検出能力、色、アナライト親和性）を有する生体高分子材料を製造することによって、広範な種類の反応およびアナライトを同定し、識別し、定量する能力を有するアレイが製造される。

### 実施例 10

#### 膜再配列の検出

##### I. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>

生体高分子リポソームを、重合性マトリックス脂質10,12-トリコサジン酸と種々のモル画分（0～40%）のPLA<sub>2</sub>基材脂質（例えば、DMPC）を水に加えた混合物をプローブ音波処理することによって調製し、その後 $1.6\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 紫外線照射(254nm)で重合した。透過電子顕微鏡による分析によって、平均小胞径が約100nmであることがわかった。

それらの初期状態においては、小胞は裸眼では深青色であり、約620nmに吸収極大を有している。40%DMPC/60%PDA、1mMの合計脂質から構成される重合性小胞を、5mMトリス緩衝液、pH7.0にて1:10に希釈して標準キュベット内で最終容量0.5mlにし、Hewlett Packard分光光度計モデル9153Cを用いてスペクトルを記録した。ハチ毒液ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (Sigma) を10mMトリス、150mM NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>緩衝液、pH8.9に溶解して最終濃度1.4mg/mlのPLA<sub>2</sub>を得た。50 $\mu\text{l}$ のこの溶液をキュベットに加え、スペクトルを60分後に記録した。DMPC/PDA小胞にPLA<sub>2</sub>を加えると、懸濁液はすぐに（すなわち数分以内に）赤色に変わり、上記図13に示したように、約540nmで最大吸収を示した。

ある範囲のmol% DMPCを含むリポソームについて、その比色応答を生じさせる能力を試験した。5マイクロリットルの1.4mg/ml PLA<sub>2</sub>を50 $\mu\text{l}$ のDMPC/PDA小胞に加えた(0.1mM最終合計脂質濃度)。実験は、標準96ウェルプレートにて、Molecular Devices UV Max kineticマイクロプレートリーダーを用い



で行った。小胞溶液の吸収は、波長620nmおよび490nmにおいて時間の関数としてモニターした。次いで、データを比色応答（CR）対時間でプロットして上記図17に示したような色応答曲線を得た。

生体触媒がDMPC/PDA小胞で生じていることを確認するために、PLA<sub>2</sub>活性を、別個に、PDAマトリックスに組込まれた標識脂質類似体を用いて測定し、生成物の形成および小胞の比色応答を同時測定した。用いた類似体は、チオエステル1,2-ビス-(S-デカノイル)-1,2-ジチオ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DTPC）であった。5マイクロリットルの40% DTPC/PDA小胞を45 $\mu$ lの40mMトリスpH7.0および5 $\mu$ lの6mM DTNBで希釈し、10 $\mu$ lの1.4mg/ml PLA<sub>2</sub>とともにインキュベートした。412nmにおける吸光度をある期間にわたってモニターした。

NMR実験を行ってPLA<sub>2</sub>による界面触媒の発生をさらに確認し、酵素反応生成物の運命についての情報を得た。スペクトルは、Bruker DMX500 NMR分光計にて11.7テスラの磁場で記録した。ブロック崩壊パルス配列を、2048収集データ点とともに用いた。各実験において、2秒リサイクル遅れで40000個の自由な誘導崩壊が蓄積された。0.1Mリン酸を外部参照として用いた。図16は、A) 混合DMPC/PDA小胞、0.1mMの合計脂質；B) PLA<sub>2</sub> (200ng) の添加後の同一小胞懸濁液についての<sup>31</sup>P NMRスペクトルを示す。

## II. ホスホリパーゼCおよびD

ホスホリパーゼDおよびCについてのアッセイをホスホリパーゼPLA<sub>2</sub>アッセイと同様の条件下で行った。全てのアッセイにおいて、1mMの40% DMPC/60% 10,12-トリコサジン酸（TRCDA）リポソームを用いた。ホスホリパーゼDおよびCの保存水溶液は、酵素を、それぞれ1mg/ml濃度にて、50mMトリス、150mM NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub> pH8.9緩衝液、および20mMホウ酸ナトリ

ウム、150mM NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub> pH8.9緩衝液に溶解することによって調製した。次いで、5 $\mu$ lのリポソーム、45 $\mu$ lの50mMトリスpH7.0（またはPLCを試験する場合には20mMのホウ酸ナトリウムpH7.0）、および5 $\mu$ lの酵素を加えることによってアッセイを行った。アッセイは、最初の10分間は2分毎に620nmおよび490

nmでモニターし、その後残りの50分間は10分毎にモニターした。

### III. プンガロトキシン

上記の実験と同様の条件下でアッセイを行った。10マイクロリットルの1 mM 40% DMPC / 60% TRCDA リポソーム、 $35\ \mu\text{l}$ の50 mM トリス pH7.4、 $15\ \mu\text{l}$ の B U T X (Molecular Probes B-3459) を、50 mM トリス、150 mM NaCl、5 mM  $\text{CaCl}_2$  pH7.4に溶解して2 mg/ml溶液を製造した。インキュベーションの最初の10分間は2分毎にスペクトルをモニターし、残りの50分間は10分毎にモニターした。490および620nmにおける吸光度は、UV最大マイクロプレオトリダーを用いてモニターした。

### IV. 阻害剤のスクリーニング

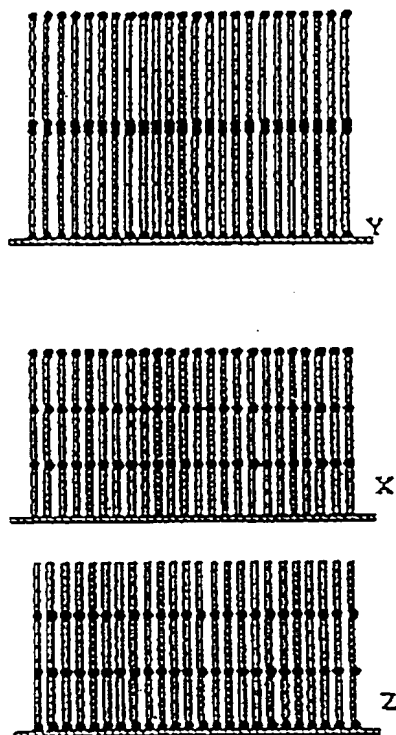
P L A<sub>2</sub>によって開始された比色事象をブロックするために阻害剤を用いた。0.6% MJ33を含むDMPC / P D A小胞を重合し、 $5\ \mu\text{l}$ の1.4 mg/ml P L A<sub>2</sub>とともにインキュベートした。5マイクロリットルの重合されていないリポソームを、 $40\ \mu\text{l}$ の50 mM トリス pH7.0、 $5\ \mu\text{l}$ のMJ33(0.006 Mの水に溶解したもの)、 $5\ \mu\text{l}$ の50 mM トリス、150 mM NaCl、5 mM  $\text{CaCl}_2$  pH8.9と混合し、15分間インキュベートした。次いで、リポソームを96ウェルプレート内で重合し、吸収スペクトルを490 nmおよび620 nmにて記録した。5マイクロリットルのP L A<sub>2</sub>を加えて、特定の時間間隔で1時間スペクトルをモニターした。Zn<sup>2+</sup>阻害のために、酵素を10 mM トリス、150 mM NaCl、0.1 mM  $\text{ZnCl}_2$  pH8.9に溶解した。

上記に挙げた全ての刊行物および特許は、参照により本明細書に含まれるものである。本発明の方法およびシステムについての種々の改良および変更が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施態様に関連して記載されているが、特許請求した本発明がそ

のような特定の実施態様に過度に限定されるものではないことが理解されるべきである。実際、本発明を実施するための記載された様式についての、材料科学、化学、および分子生物学または関連分野における当業者に明らかな種々の修飾は下記の特許請求の範囲に含まれるものである。

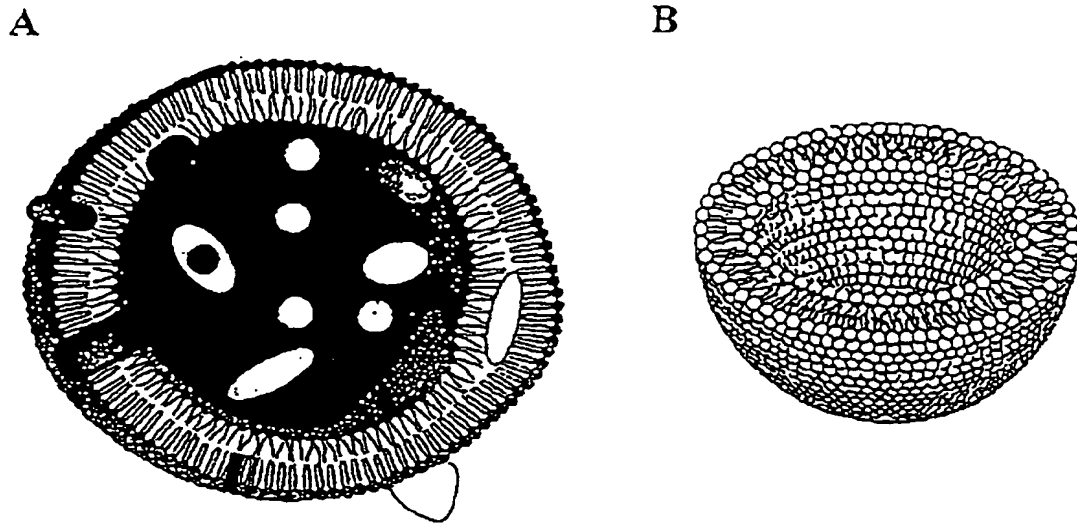
【図1】

FIGURE 1



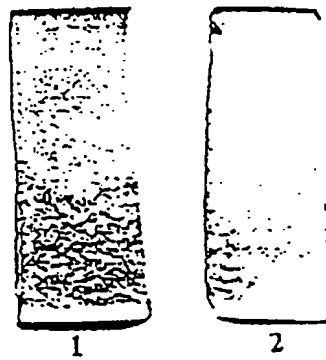
【図2】

FIGURE 2



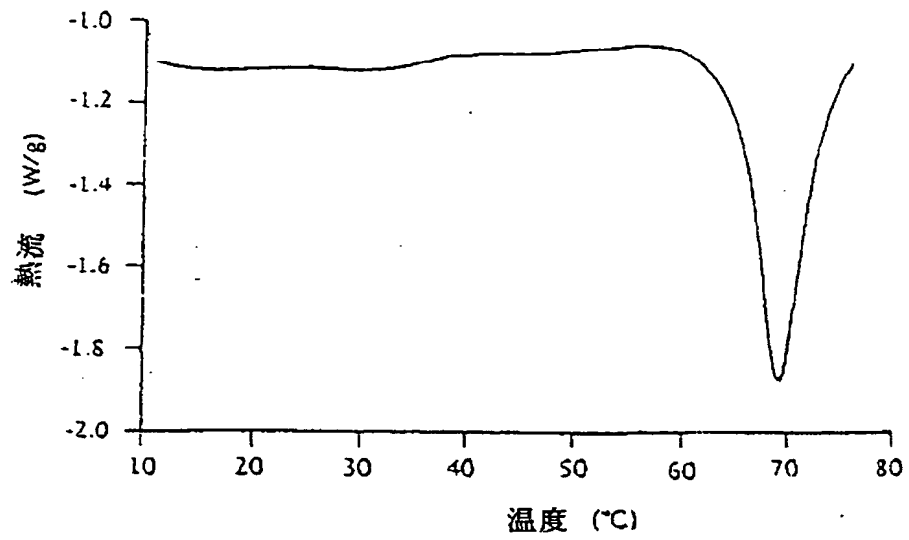
【図3】

FIGURE 3



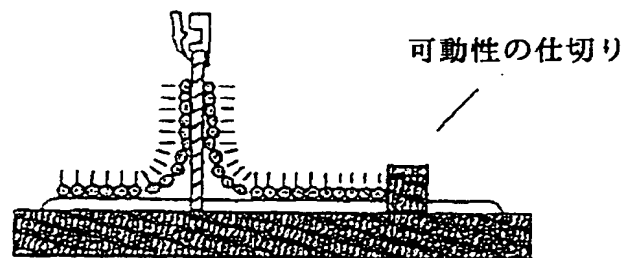
【図4】

FIGURE 4



【図5】

FIGURE 5



【図6】

FIGURE 6



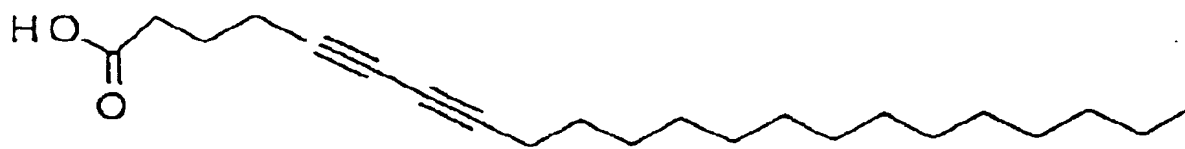
【図7】

FIGURE 7



【図8】

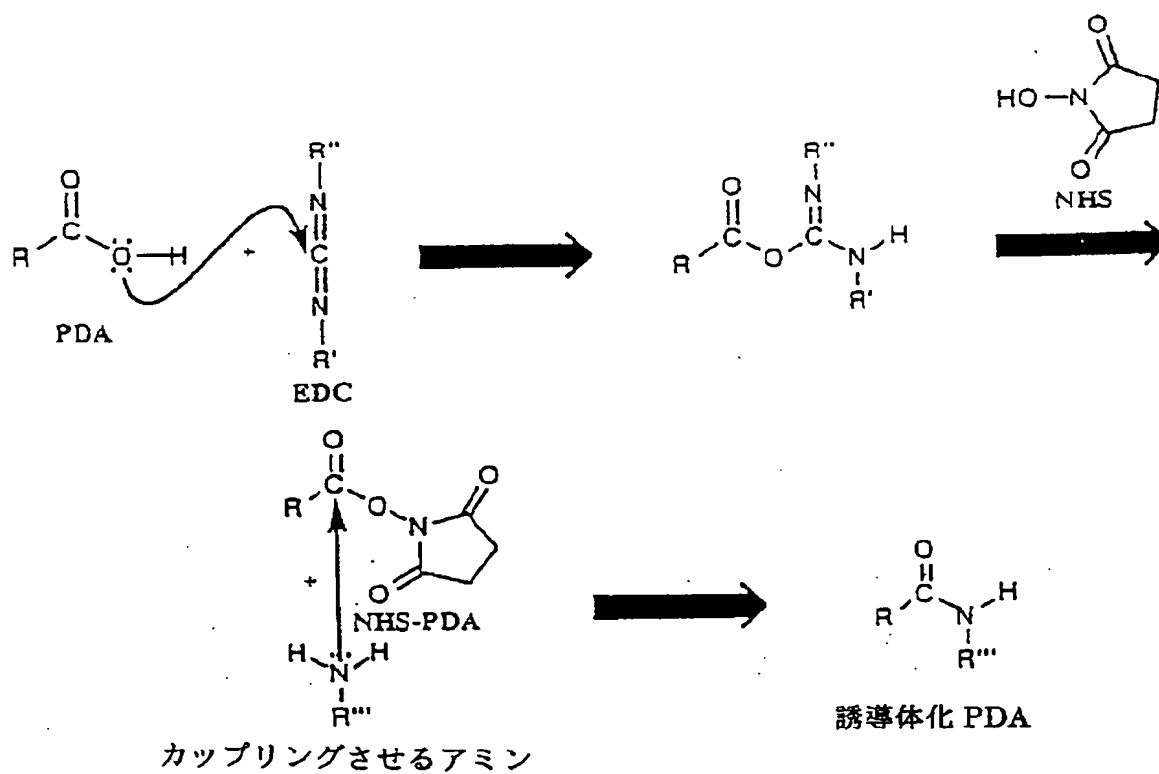
FIGURE 8



【図9】

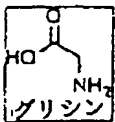
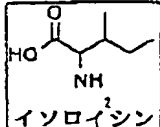
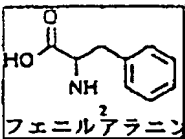
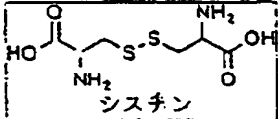
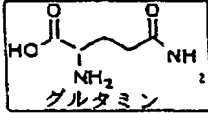
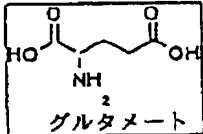
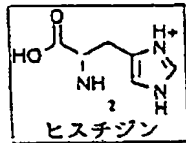
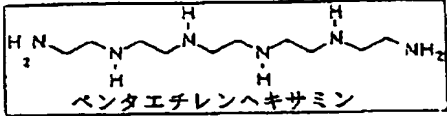
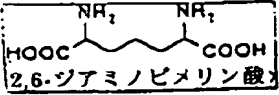
FIGURE 9

10,12-ペンタコサジン酸へのアミンカップリング



【図10】

FIGURE 10

	水に対する 溶解性	薄膜および リボソーム の形成能	薄膜および リボソーム の色	基本的な 比色応答
 グリシン	高	有	青	有
 イソロイシン	低	無	NA	NA
 フェニルアラニン	低	無	NA	NA
 シスチン	高	有	青	有
 グルタミン	高	有	青	有
 グルタメート	高	有	青	有
 ヒスチジン	高	有	濃青	有
 ペンタエチレンヘキサミン	非常に高	有	濃青	無
 2,6-ジアミノピメリン酸	非常に高	NA	NA	NA



【図11】

FIGURE 11

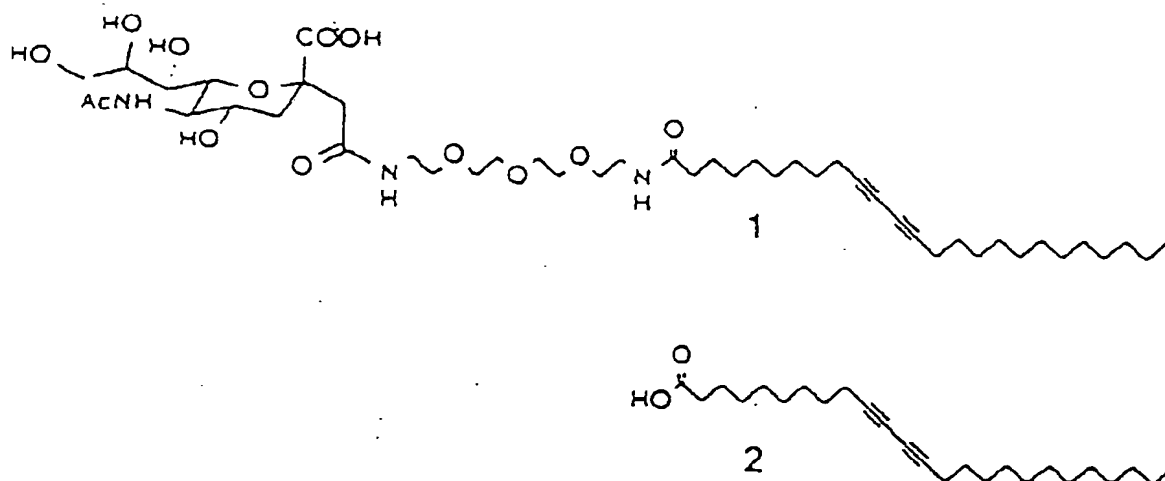
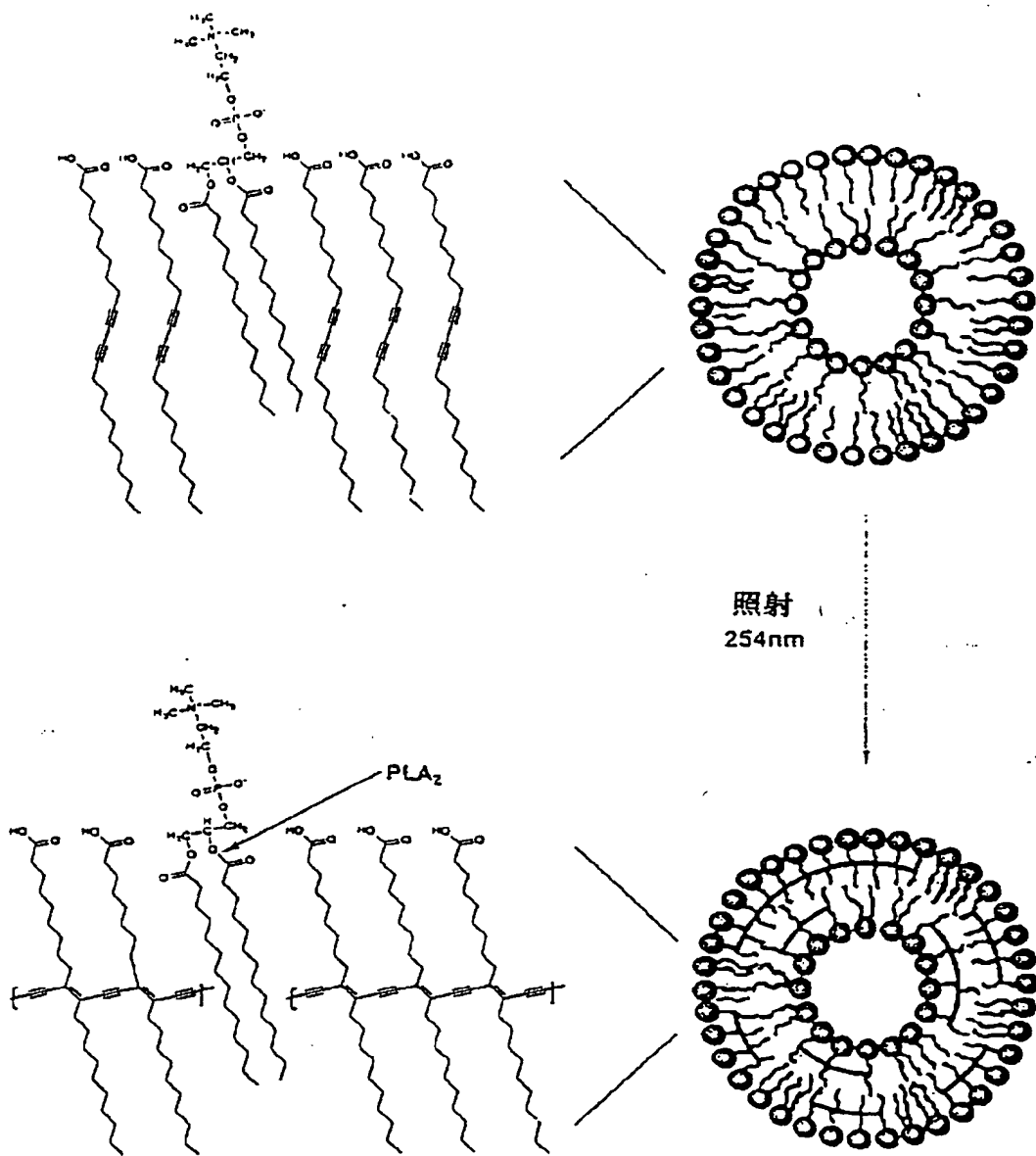
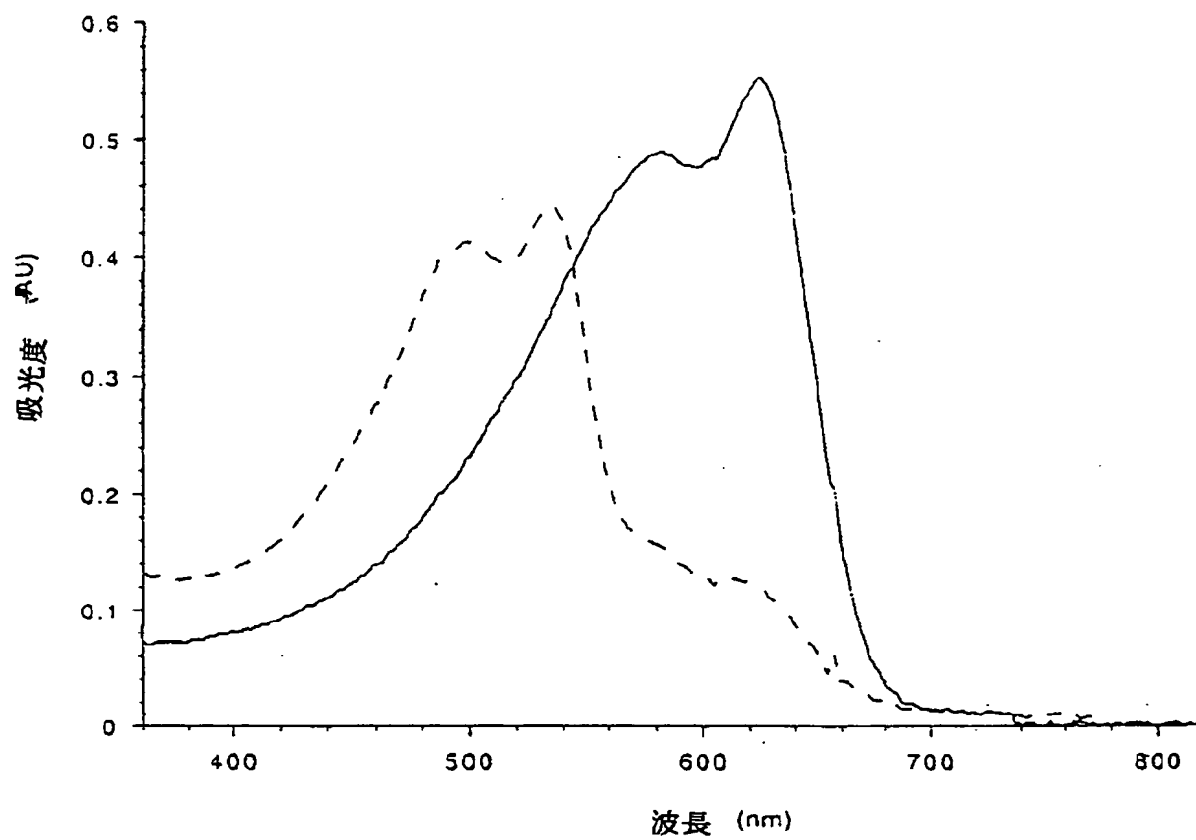


FIGURE 12



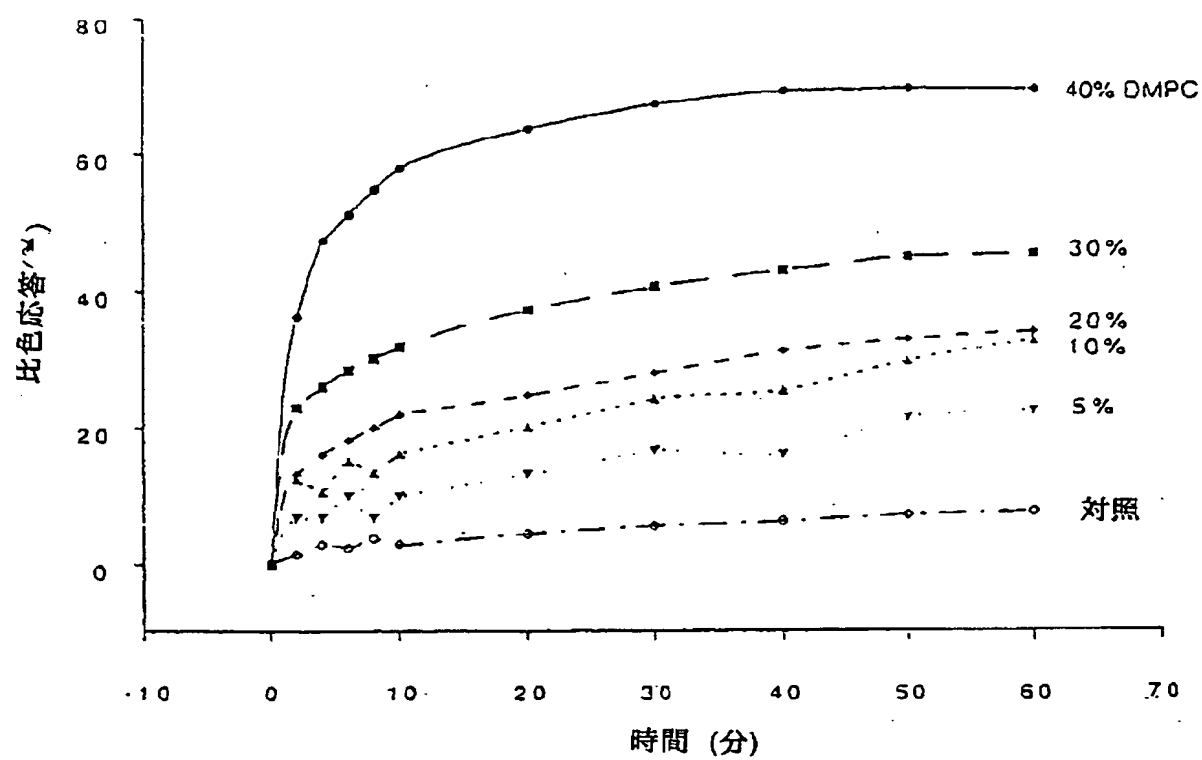
【図13】

FIGURE 13



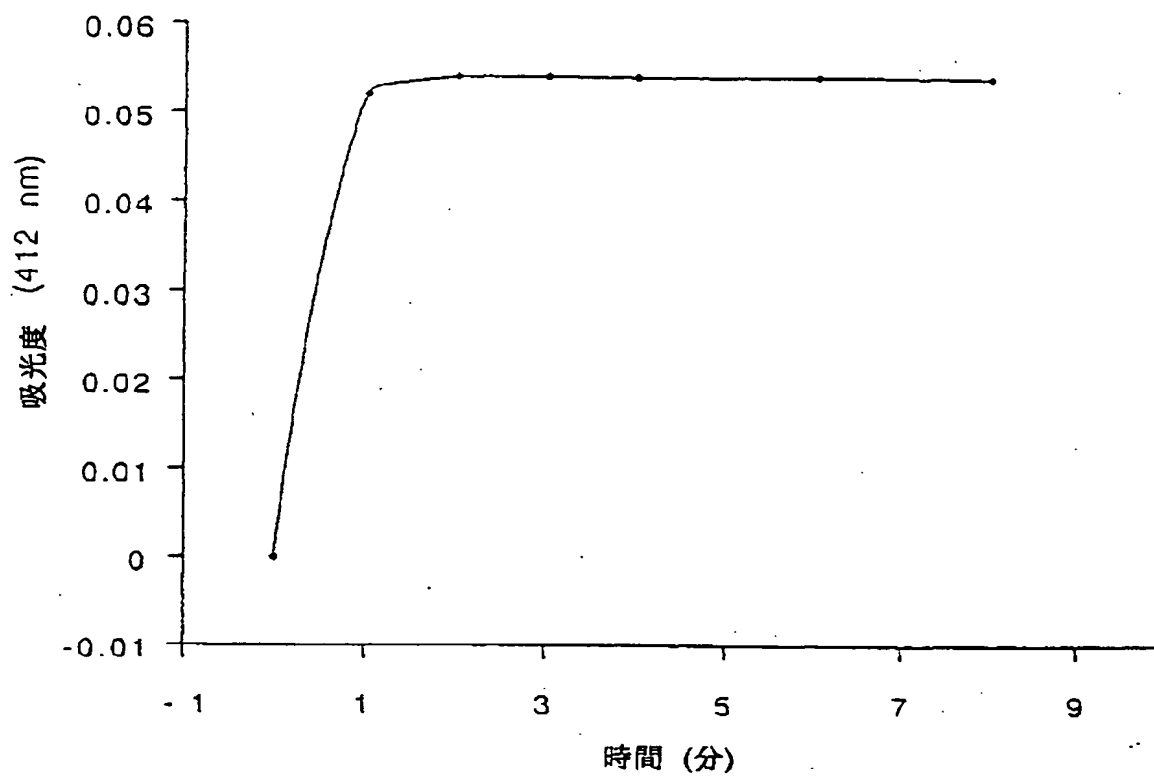
【図14】

FIGURE 14



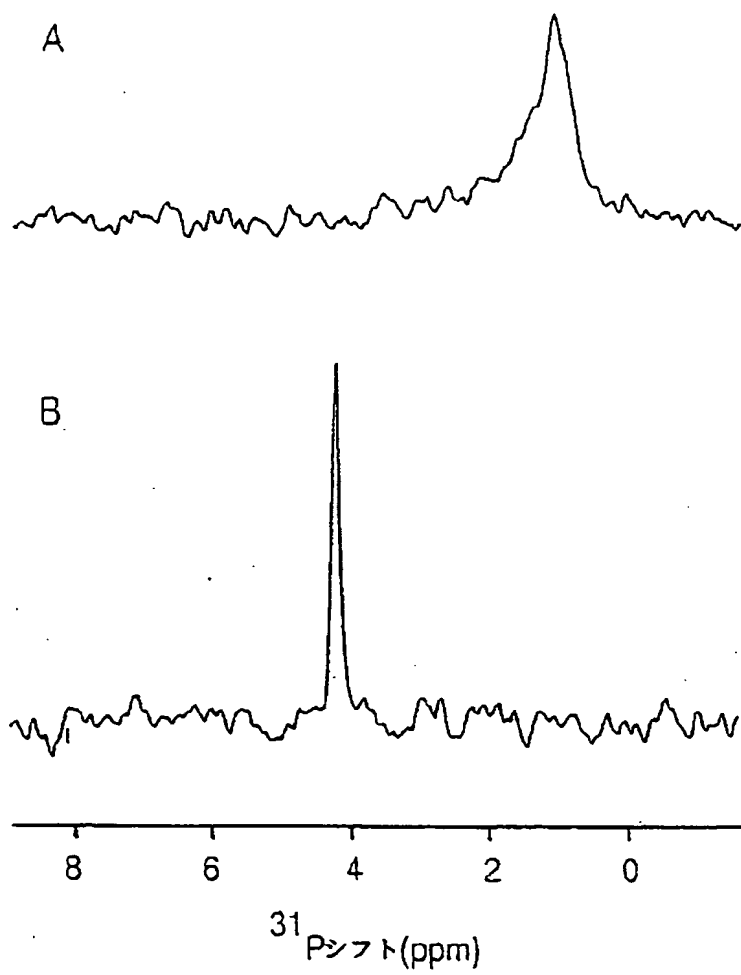
【図15】

FIGURE 15



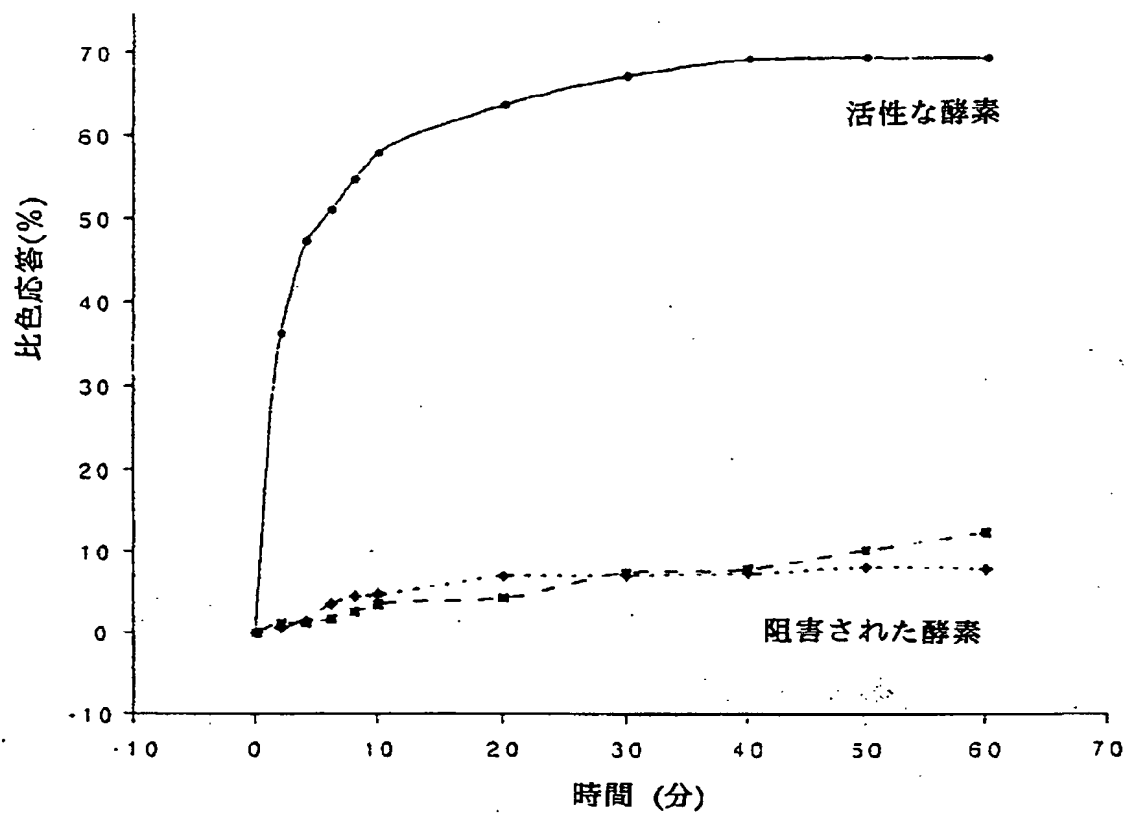
【図16】

FIGURE 16



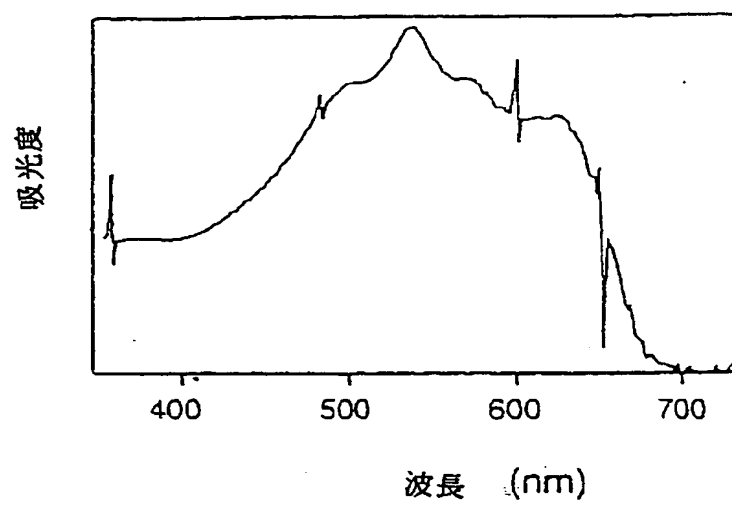
【図17】

FIGURE 17



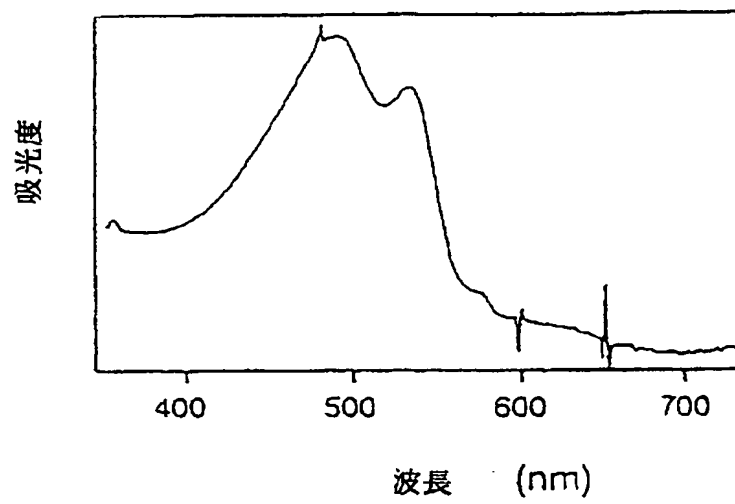
【図18】

FIGURE 18



【図19】

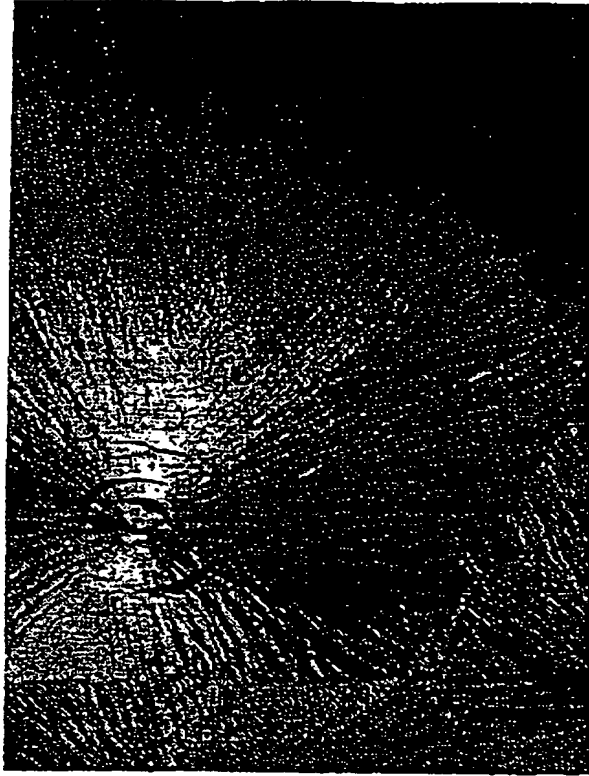
FIGURE 19





【図20】

FIGURE 20



【図 2 1】

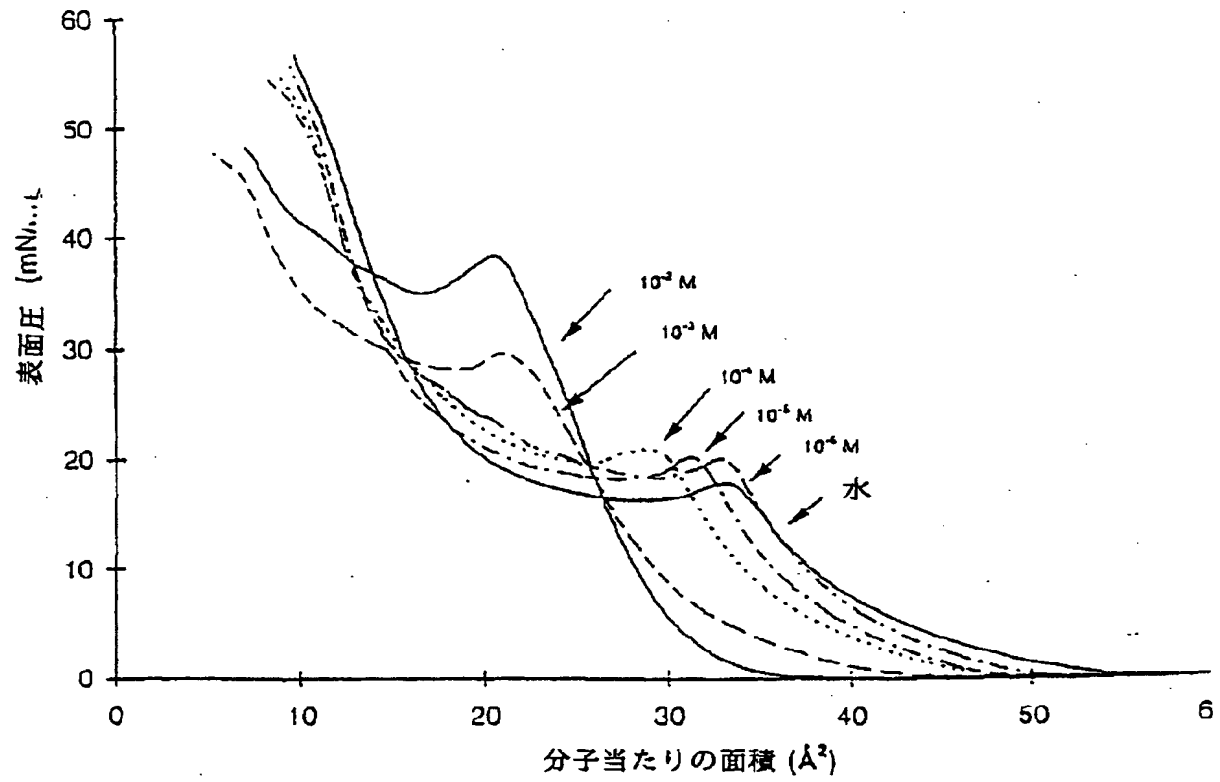
FIGURE 21

GM1 のバイオセンシング単分子層集合体の特性および比色応答

薄膜組成	初期吸光度	単分子層 転移速度	緩衝液中 の CR	アナライト 中の CR
100 % PDA	0.052	0.94	0.02	0.02
5% GM1/95% PDA	0.049	0.89	0.03	0.03
20% GM1/80%PDA	0.018	0.34	0.03	0.04
5%SA-PDA/95%PDA	0.038	0.77	0.06	0.07
20% SA-PDA/80% PDA	0.032	0.62	0.14	0.15
5%GM1/5%SA-PDA/90% PDA	0.036	0.87	0.06	0.28
20%GM1/5%SA-PDA/75% PDA	0.014	0.33	0.10	0.13

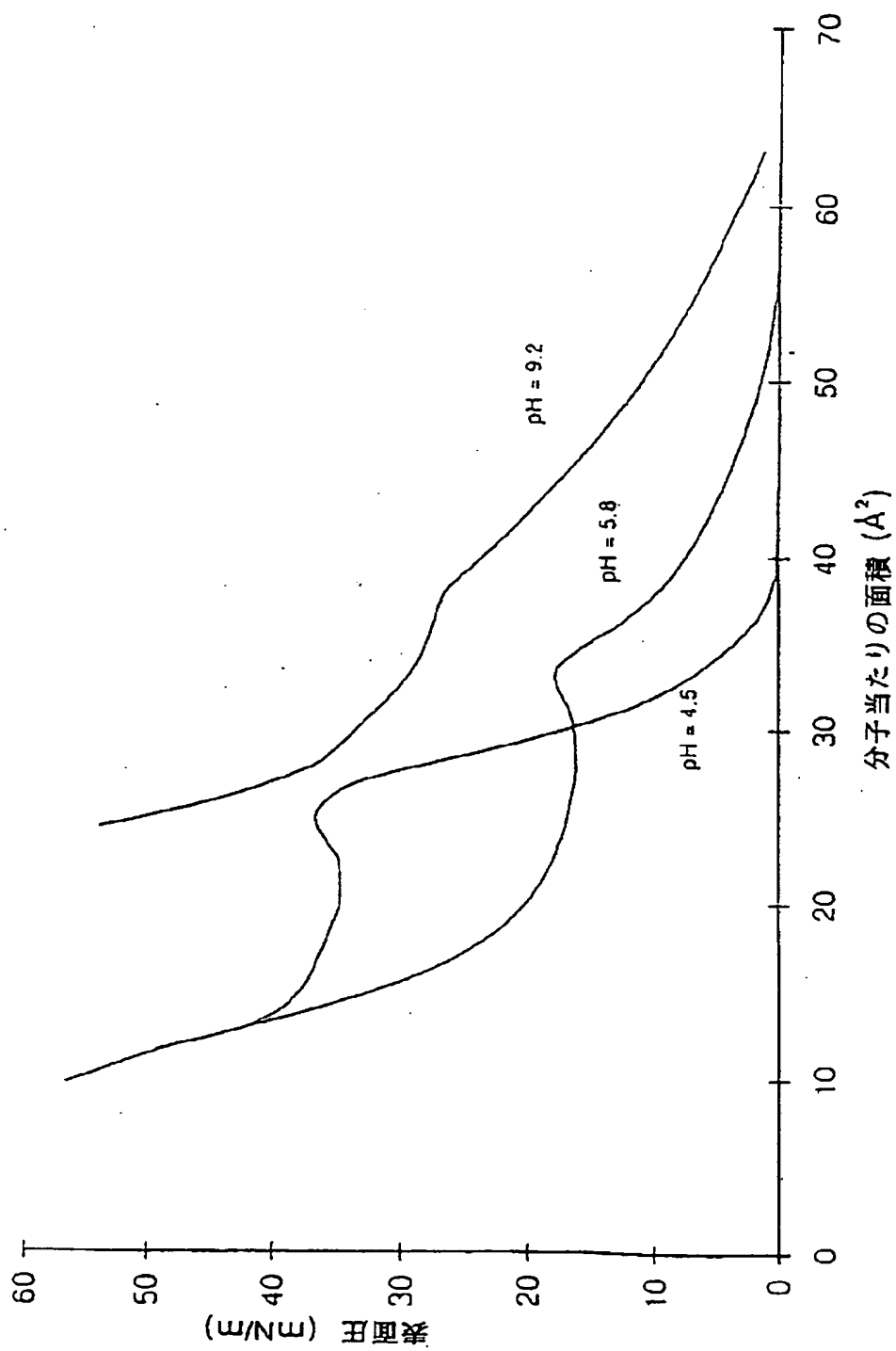
【図22】

FIGURE 22



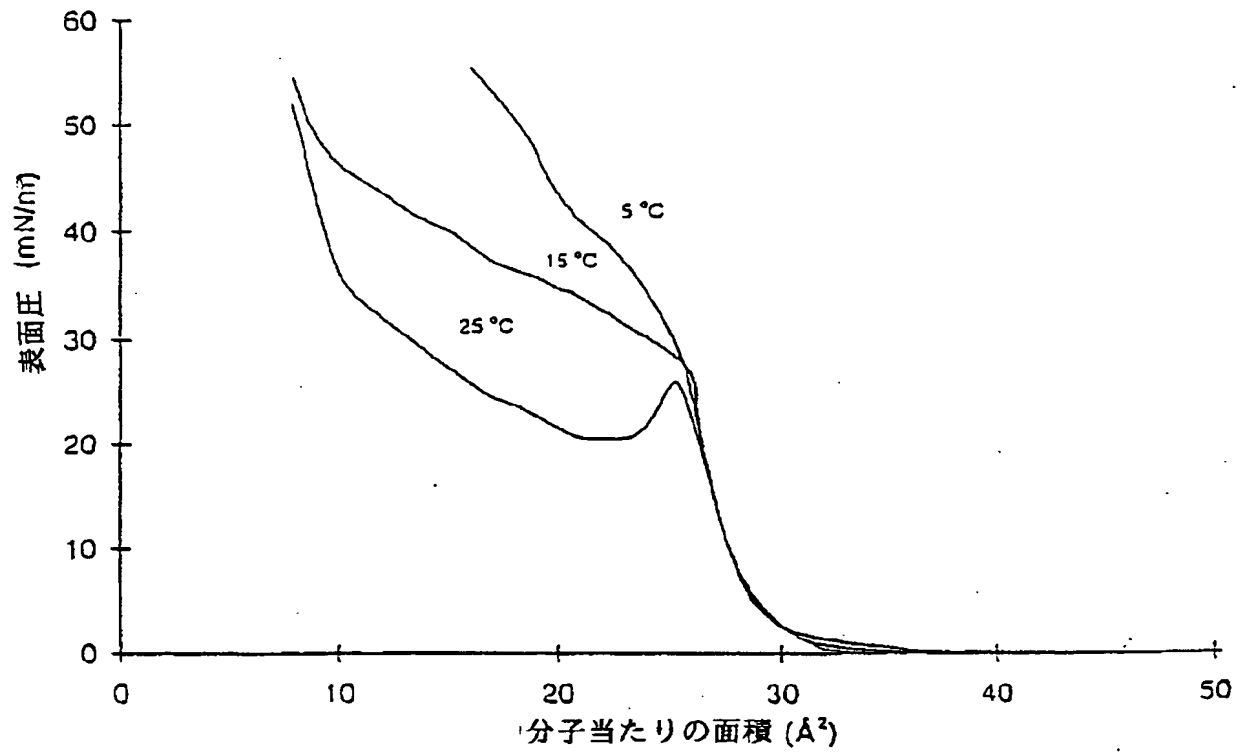
【図23】

FIGURE 23



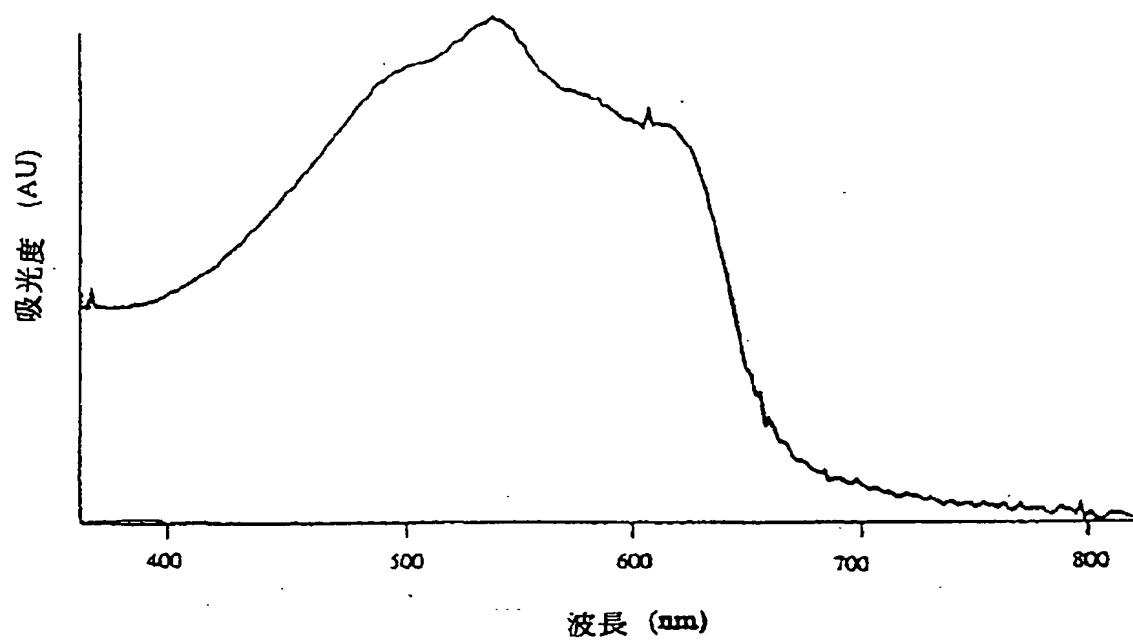
【図24】

FIGURE 24



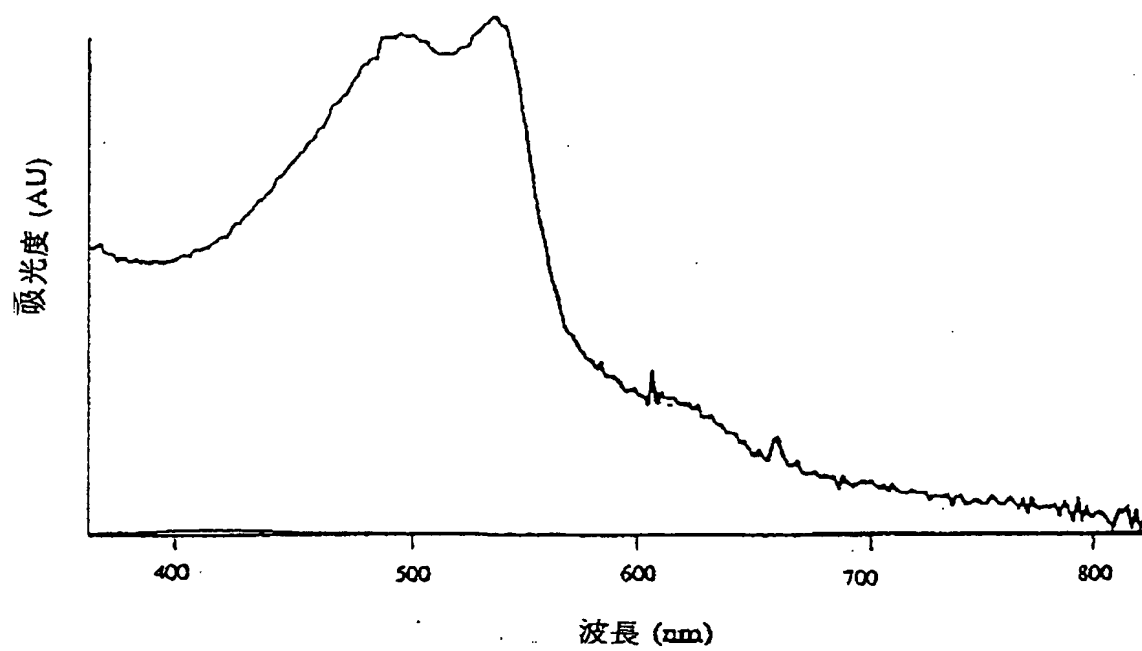
【図25】

FIGURE 25



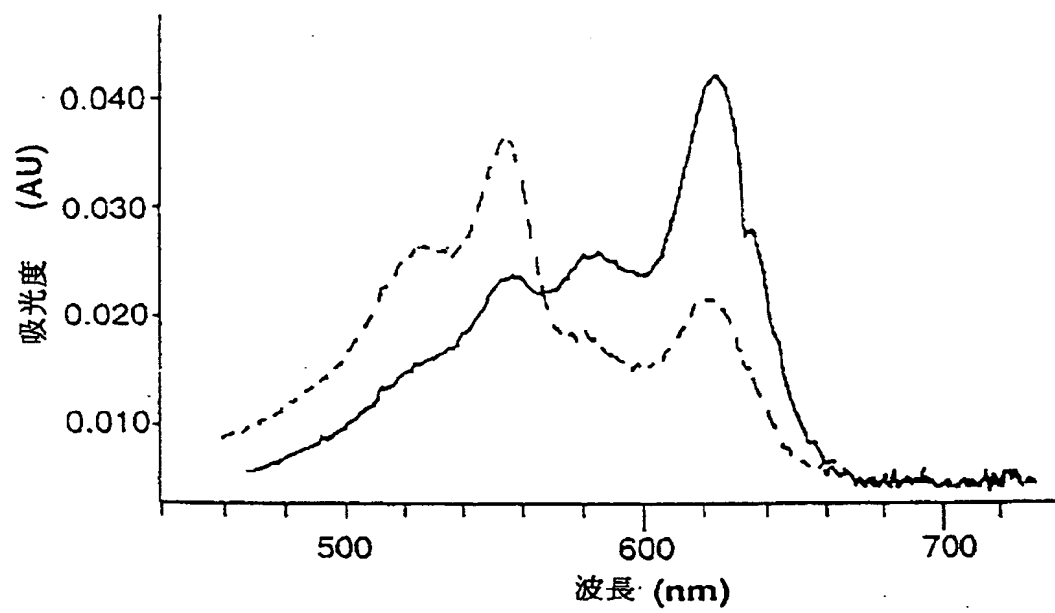
【図26】

FIGURE 26



【図 27】

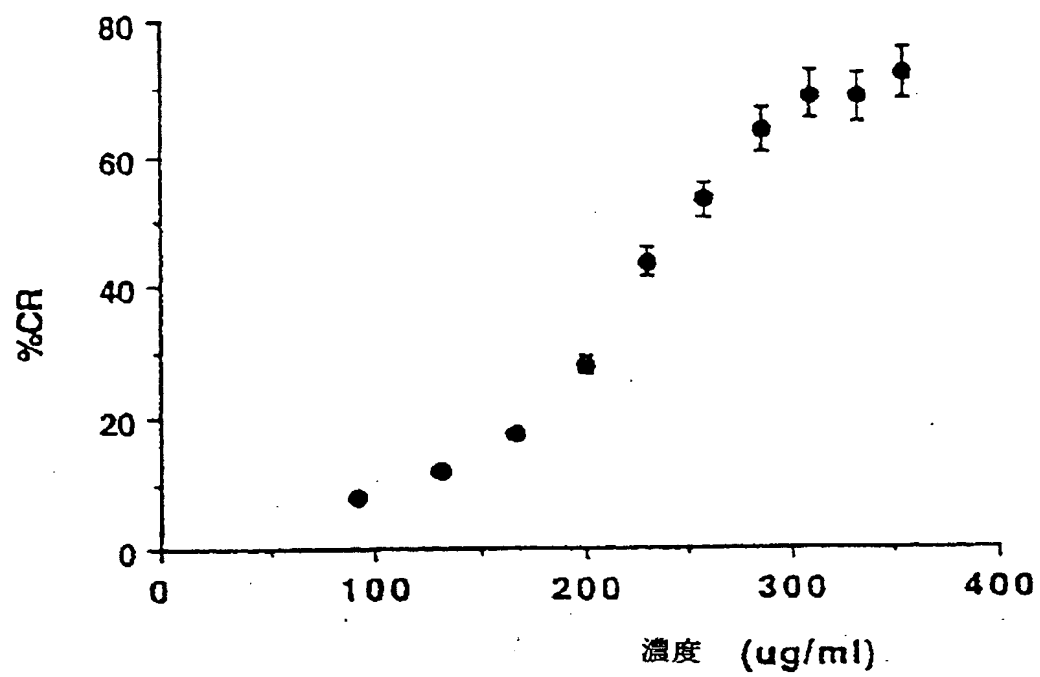
FIGURE 27





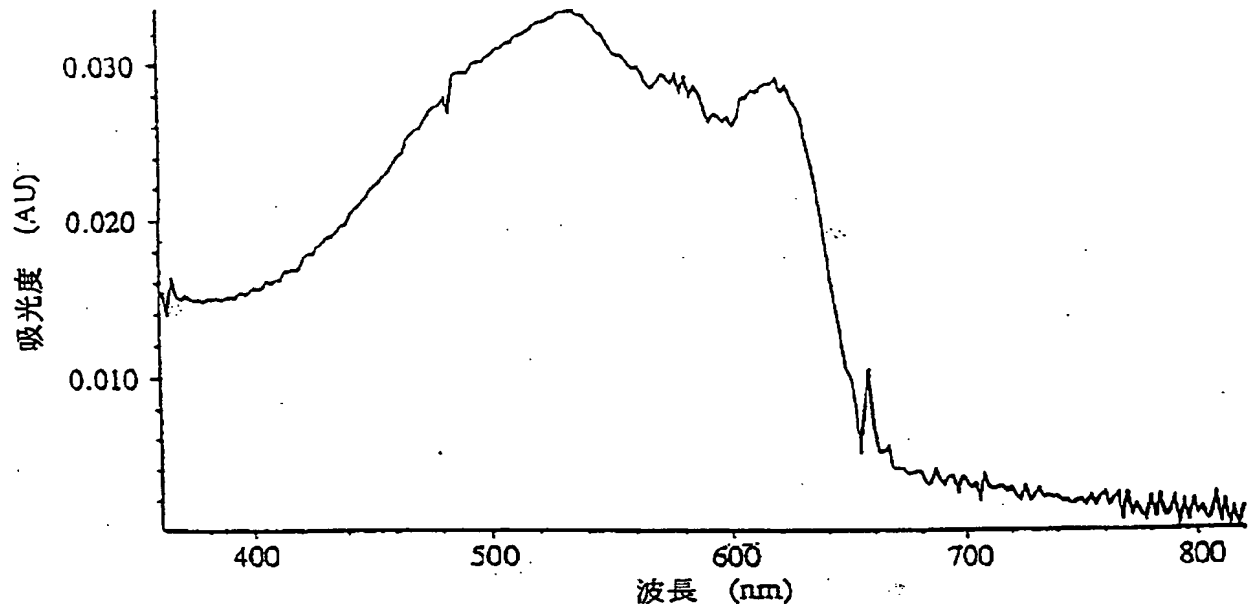
【図28】

FIGURE 28



【図29】

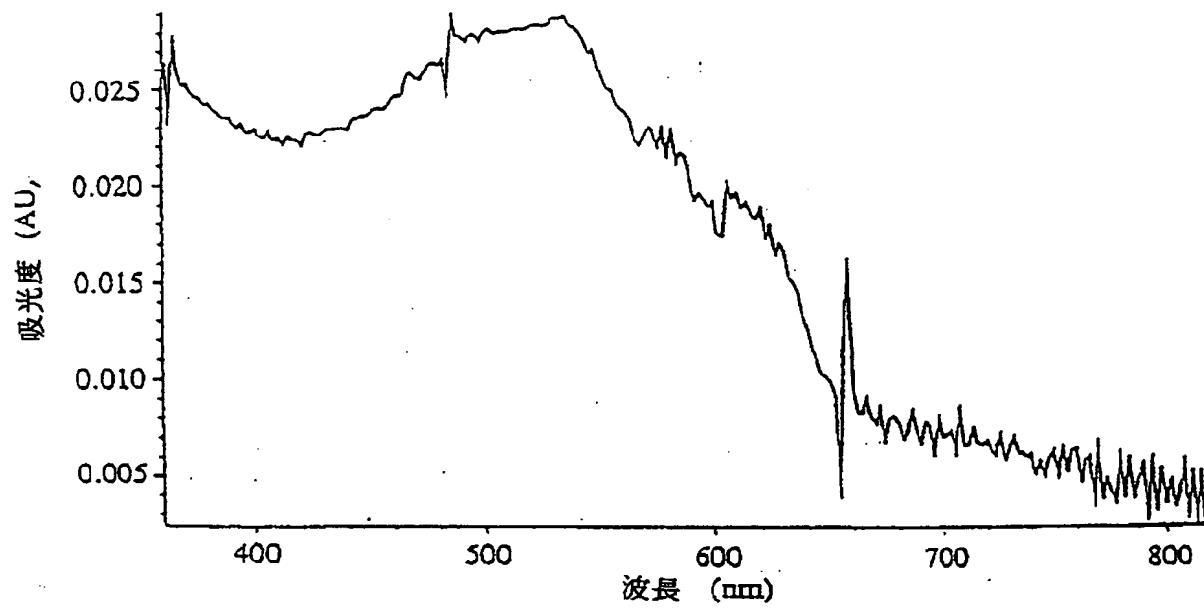
FIGURE 29



大腸菌毒素に曝露する前のリボソームの色

【図30】

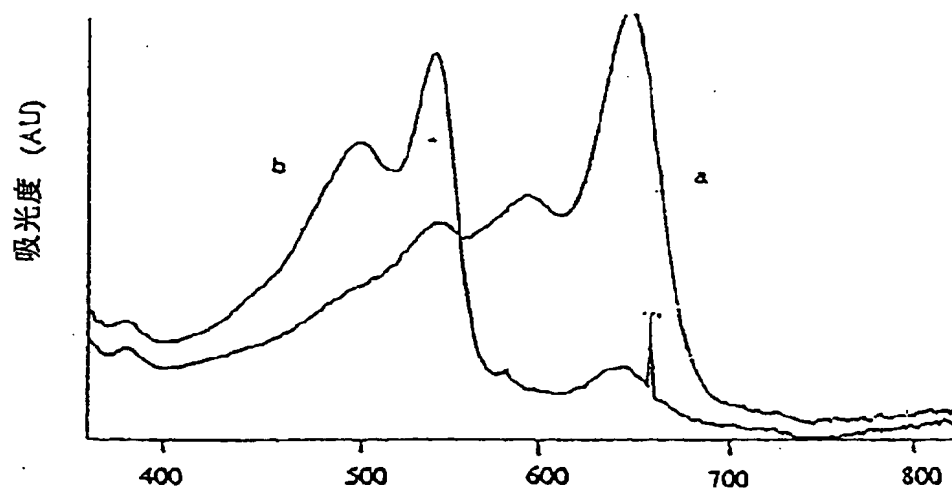
FIGURE 30



大腸菌毒素に曝露した後のリボソームの色

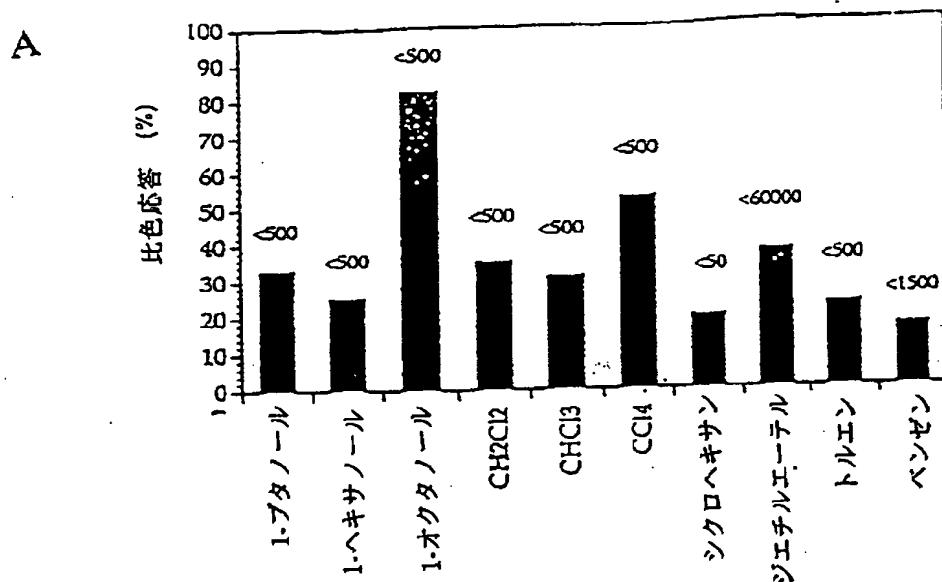
【図31】

FIGURE 31



【図32】

FIGURE 32



B

溶媒	水中での飽和濃度 (重量%)	溶媒	水中での飽和濃度 (重量%)
ヘキサン	0.0011	1-オクタノール	0.054
シクロヘキサン	0.0055	1-ヘキサノール	0.077
ジエチルエーテル	6.0	1-ブタノール	7.45
トルエン	0.051	CCl <sub>4</sub>	0.077
ベンゼン	0.179	CHCl <sub>3</sub>	0.815
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.3

【図 3 3】

FIGURE 33

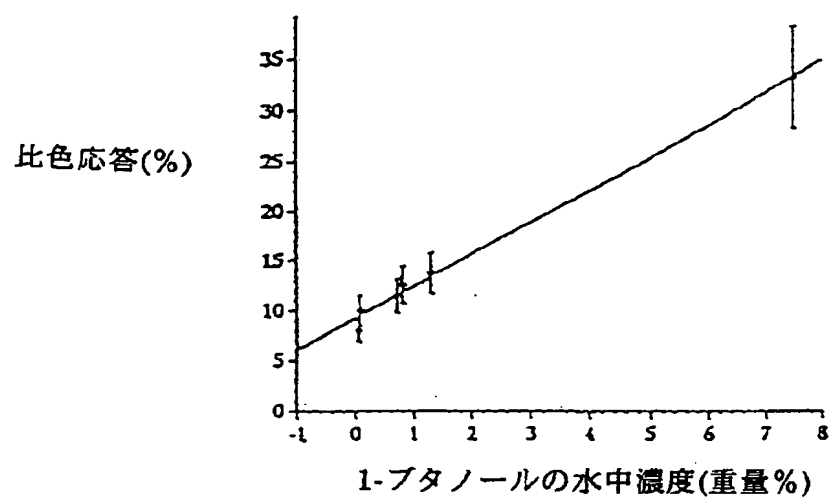
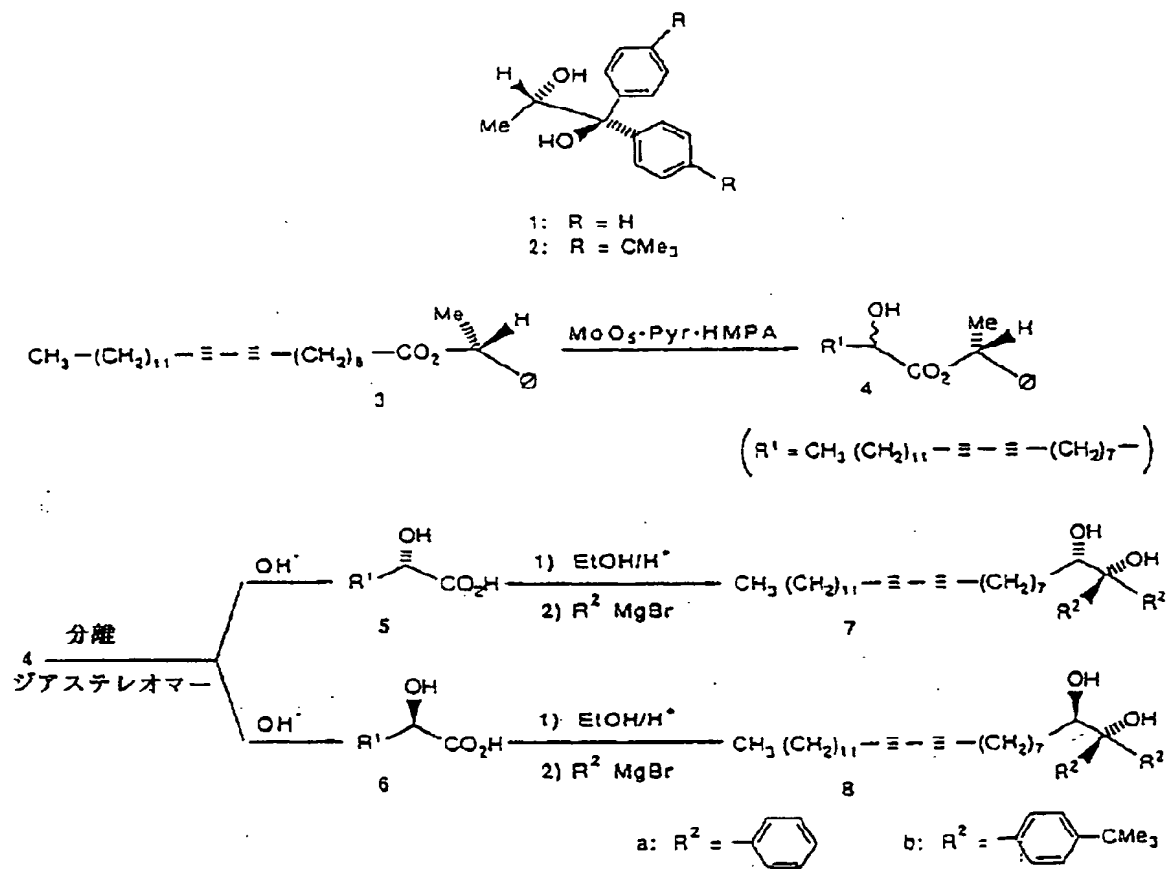
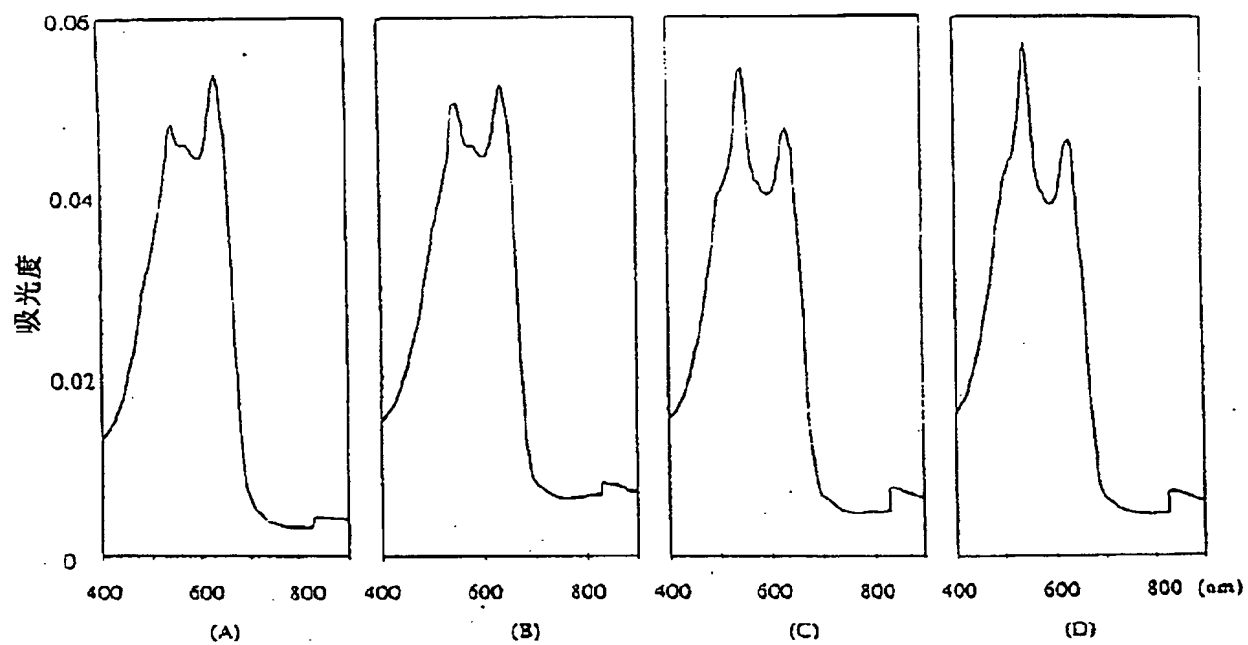


FIGURE 34



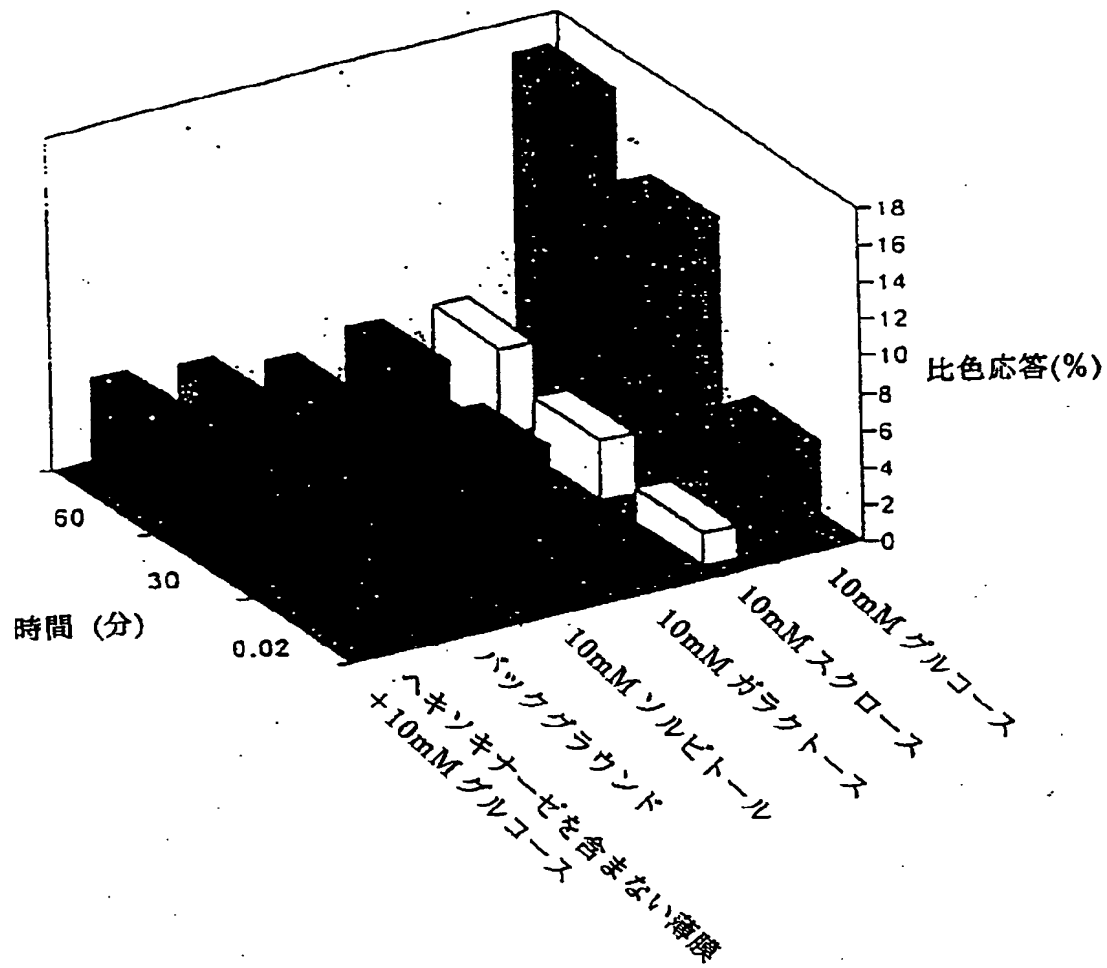
【図 35】

FIGURE 35



【図36】

FIGURE 36

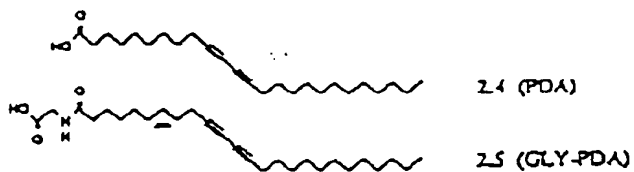




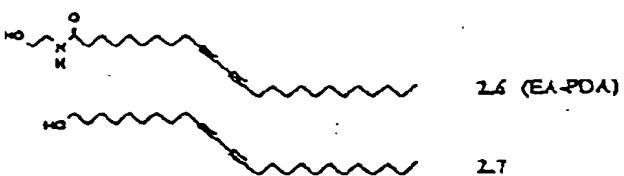
【図37】

FIGURE 37

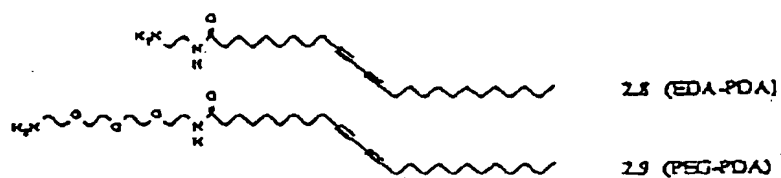
酸性ヘッド基



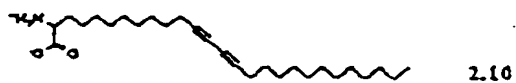
中性ヘッド基



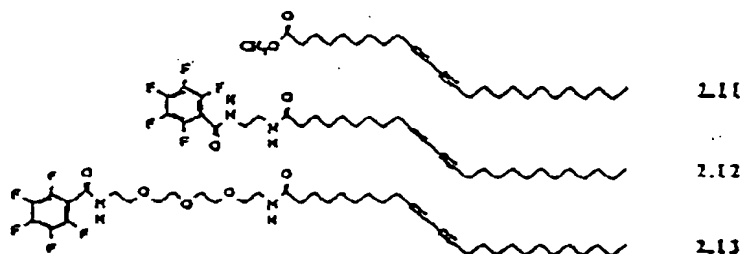
塩基性ヘッド基



両イオン性ヘッド基

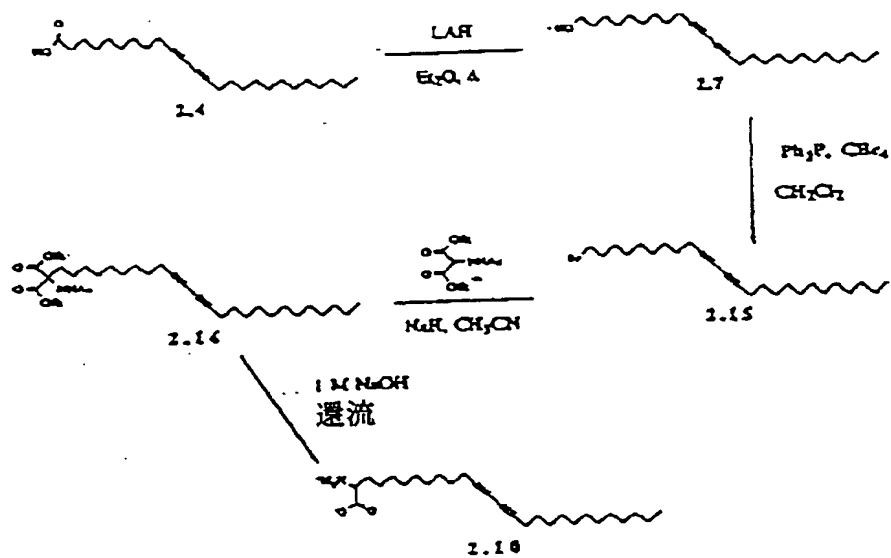


疎水性ヘッド基



【図38】

FIGURE 38



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US98/03963

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) :G01N 21/17 US CL :435/4, 15, 18; 436/71, 164, 166, 169 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 15, 18; 436/71, 164, 166, 169 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,268,305 A (RIBI ET AL) 07 December 1993 (07.12.93), see column 7, lines 28-34; column 8, lines 6-17; column 9, line 56 - column 10, line 5; column 11, lines 6-8; column 15, lines 1-15 and 33-43; and column 16, line 49 - column 17, line 40.	1-51
X	CHARYCH ET AL. Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by a polymerized bilayer assembly. Science. 30 July 1993, Vol. 261, pages 585-588.	1, 3-15, 18, 20-31, 34-36, 38-49
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 05 MAY 1998		Date of mailing of the international search report 01 JUN 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JAN M. LUDLOW Telephone No. (703) 308-0661

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US98/03963

**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

**APS, CAS ONLINE**

search terms: diacetylene# or liposome# or vesicle# or membrane#; lipase# or phospholipase# or cleav?; inhibit?; color? or spectrophoto? or spectroscop? or optie? or chrom? or biochrom?

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**